

後発医薬品の溶出挙動を、パドル法、回転数50rpmで、4液性の試験液(pH 1.2, pH 6.8, その他のpHには薄めたMcIlvaineの緩衝液および水)で比較することとされた。同等性ガイドライン中の溶出試験の役割は、①生物学的同等性のサポートと、②胃酸度等の個体差に対応したBEの保証である。前者に対しては、薬物動態パラメータのバラツキの大きな医薬品で、ヒト試験では同等性を証明することが難しい場合、90%信頼区間で生物学的非同等と判定されたものでも、溶出挙動が同等である場合には、多数の被験者を用いないで同等性製剤として認められる救済措置が設けられている。後者に関しては、pH 6.8の中性領域(塩基性薬物ではpH 3.0~6.8)の試験液での溶出挙動が大きく異なる場合には、生物学的同等性試験を低胃酸被験者により実施することが必要で、胃酸度の違いがあっても、生物学的同等性を保証しなくてはならないようになっている。同等性ガイドラインの詳細に関しては、まとまった総説が出されており、こちらを参照されたい<sup>2)</sup>。

なお、同等性ガイドラインでは、徐放性製剤においては放出機構が類似していることが不可欠であり、指定時間の溶出率が標準製剤の±15%以内でなければ、「類似している」とは見なされないこととなっているが、通常製剤では、溶出挙動が類似していなくても、ヒト試験で生物学的同等性が証明できれば、同等の医薬品と判定される。したがって、ガイドラインに従って承認された後発医薬品では、メーカー間で溶出挙動を比較して、例えば異なった結果が得られたからといって、必ずしも同等性が成り立っていないとは限らない。ただし、実際には、新しい後発医薬品にあっても、先発医薬品の溶出特性に合わせる方向で申請するケースが多いと考えられ、後発医薬品のメーカー間での溶出挙動は類似していく方向にあると思われる。

## 2. 既承認後発医薬品の同等性確保

生物学的同等性ガイドラインが出される前に承認された多くの後発医薬品に関しては、先発医薬品との同等性が担保されていないおそれがあった。同等性の確保のためには、同等性ガイドラインによる再評価が望ましいと思われたが、個々の医薬品に対して、ヒトによる同等性試験を迅速に実施することは、経費的にも、時間的にも不可能と判断された。そこで、同等性ガイドライン中の溶出試験に対する思想である、「先発品と後発品の溶出

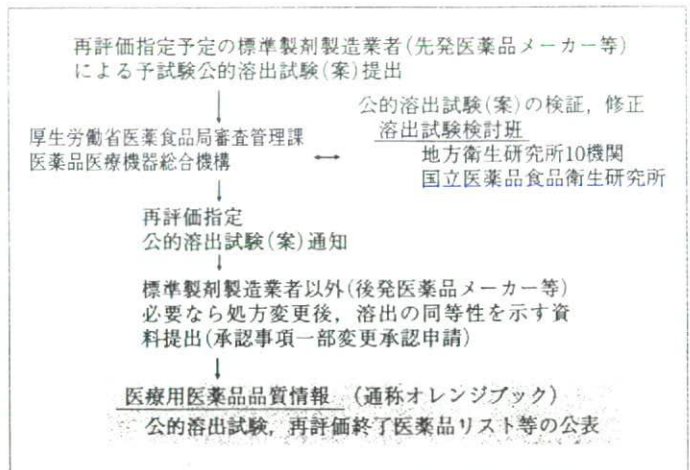


図2 後発医薬品の品質再評価の流れの概略

速度が類似していれば、そのバイオアベイラビリティに著しい差が生じる可能性は少ない」が、最大限に活用され、わが国の後発医薬品の品質再評価は大きな転機を迎えることとなった<sup>3,4)</sup>。

平成10年7月に発出された、医療用医薬品の品質に係る再評価の通知により指定された後発医薬品は、溶出試験による同等性を確保する方針が出された。再評価対象医薬品は、内服固形製剤のうち、①日本薬局方収載製剤、②日本抗生物質基準収載品目のうち溶出試験が設定されているもの、③その他溶出試験を必要としないものを除いたものであった。なお、この当時の日本抗生物質基準収載品目は、第14改正日本薬局方第一追補で薬局方へ収載され、現在は局方収載品となっている。また、その他、造影剤、消化酵素製剤、制酸剤、生薬・エキス製剤等や注射剤など、溶出試験でなく、それぞれの規格試験での品質管理が適切と思われるものは対象外となっている。

品質再評価は、過去7年にわたって順次進められているが、その実施手順の概略を図2に示した。品質再評価指定予定の医薬品は、標準製剤製造業者(先発医薬品メーカー)が標準的な溶出試験条件で実施した溶出試験結果を基に、標準製剤(標準ロット)を選定し、公的溶出試験(案)等を提出する(再評価申請)。公的溶出試験(案)は、10カ所の地方衛生研究所<sup>5)</sup>と国立医薬品食品衛生研究所からなる溶出試験検討班により、実際に溶出試験を実施しながら方法の妥当性が検証され、適切な修正を得て、公的溶出試験(案)が再評価指定とともに通知される。なお、再評価における標準的な溶出試験条件の設定方法は、基本的に「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインについて」の手順に従っている。



溶出率85%を達成する時間が1時間を超え、あまり長い場合には、別の試験液の追加、回転数の増加、界面活性剤の添加等の順に、溶出試験条件の変更が考えられる。公的溶出試験は、試験時間はできるだけ1時間以内、原則として70~80%の範囲内の溶出率の下限値で設定し、治療域が狭い薬物等では上限値および下限値の規格、2時点以上の規格を設定することとされている。試験液は、製剤間の溶出性の差を最大限識別するために、15分から1時間の間に溶出率85%以上となるものから、なるべく溶出の遅いものが選択される。

品質再評価申請者(後発医薬品メーカー)は、溶出パターンを先発医薬品メーカーから供給された標準製剤に合わせるため、必要な範囲で処方変更等を行い、標準製剤との溶出挙動の同等性および公的溶出試験(案)への適合性を確認して、資料等を提出する(承認事項一部変更承認申請)。最終的に、標準製剤との溶出挙動の比較、公的溶出試験への適合性の評価判定終了が通知され、オレンジブックに記載される。オレンジブックには、再評価が終了した先発および後発医薬品リストのほか、公的溶出試験の試験方法と、溶出試験規格、先発医薬品メーカーの標準製剤のpH 1.2~6.8における溶出パターン、各医薬品の溶出試験液への溶解度、pKa等の物理化学的性質が記載されている。オレンジブックは、後発医薬品再評価の進捗状況の確認に役立つばかりでなく、製剤特性を知る上で極めて有用な、世界に例を見ない品質情報集でもある<sup>4)</sup>。

### 3. 後発医薬品の品質再評価の最近の状況

品質再評価の進捗状況は、平成17年12月の時点で、候補となった857成分のうち、459成分について再評価が終了し、承認整理されたものや、再評価対象から除外されたものを除いた残り約150成分について、平成18年度中をめどに評価終了予定となっている。ここで、承認整理されたものとは、先発医薬品メーカーでも製剤特性が悪く、製剤設計のやり直しが必要と判断されたものや、後発医薬品メーカーで溶出プロファイルを合わせるための処方変更が不可欠であったもので、その数は、再評価候補となった成分の約1割にのぼった。

品質再評価は、後発医薬品の同等性の確保のための対策の色合いが濃いものではあるが、一方では溶出試験規格のない医薬品の溶出試験規格を網羅的に設定することを目指しており、品質の悪い製剤の淘汰が起こっている。

再評価対象から除外されたものは、製剤特性に疑問があるもの(胃溶性コーティング製剤など)、体内で吸収されないもの、口腔内崩壊錠などで通常の溶出試験での評価が適切でないもののほか、難溶性薬物や分解性薬物、分析方法の特異な医薬品等で、溶出試験の設定が不可能と判断されたものなどである。最近、品質再評価における、難溶性薬物等に対する溶出試験条件設定のための手順が新たに示されている<sup>6)</sup>。難溶性薬物で、試験液の変更、回転数の増加、最大5%のポリソルベート添加あるいは5%SDS添加等を検討しても、6時間以内に85%の溶出を確保できないものは、溶出規格を設定しないこととされている。

なお、界面活性剤を高濃度添加しないと溶出試験が実施できない場合には、製剤間の溶出の差が十分に認識できない可能性があり、生物学的同等性を類推することは困難であると考えられるため、界面活性剤の濃度はできるだけ低くする方針がとられている。

また、通常の規格試験で用いる分析法では溶出試験を実施できない製剤の場合、その他の適切な高精度分析法が見いだされないと、溶出試験の対象から除外されることになる。最終的に、それぞれの事情により再評価対象から除外された後発医薬品の品質をどのように評価するかは、今後の宿題として残ることになる。

### 4. 後発医薬品の品質評価に関する最近の報告から

平成14年の診療報酬改定の告示では、後発医薬品調剤加算、品質情報提供料が新設され、さらに同年6月には国立病院・療養所に対する後発医薬品の採用要請の通知が出されたために、後発医薬品への関心が急速に高まった。そのような中で、後発医薬品等の品質に関する多くの検討結果が報告されている<sup>7~11)</sup>。後発医薬品のメーカー間での溶出挙動が同等であったという報告がいくつか見られ、品質再評価の有効性を示している事例と見られる<sup>7~9)</sup>。他方、後発医薬品の溶出試験が公的溶出規格に適合しなかったという報告も見られるが、品質再評価が進行中であるために、公的溶出試験(案)が出された段階で、後発医薬品メーカーが公的溶出試験に対応する前の製剤を用いた試験結果<sup>10)</sup>や、比較に用いられた先発医薬品メーカーの溶出挙動がオレンジブック記載の標準製剤の溶出挙動とかなり異なっているもの<sup>11)</sup>があった。

品質再評価では、先発医薬品メーカーの3ロットの試験を行い、中間の溶出挙動を示すロットを標準製剤とし



て後発医薬品メーカーに配布しており、先発医薬品メーカーのロット間のバラツキによっては、市販ロットを比較の対象とするのは慎重を要する。また、公的溶出試験に対応後の後発医薬品でも、溶出規格には適合するが、各液性での溶出パターンがわずかに同等とならない場合もあり、後発医薬品側のロット間での変動が影響していると考えられた。再評価終了後は、後発医薬品のメーカー間での溶出挙動の差は、それ以前に比べると格段に小さくなっており、先発医薬品および後発医薬品のロット間のバラツキの要因に加え、研究室や使用機器などによる溶出試験の結果の不確かさを考慮すると、実際に得られた溶出の同等性の許容範囲からのわずかなずれを判定するのは難しい。

また、後発医薬品のメーカー間での治療効果の差、生物学的非同等を示した報告は見られないが、プレドニゾロン錠に関する報告がしばしば引用されている<sup>12)</sup>。ただし、プレドニゾロン錠は局方収載品で、いわゆる後発医薬品ではなく、品質再評価の対象となっていないものであった。これは、溶出試験の限度規格には適合していても、メーカー間で溶出パターンが異なって、臨床効果に差が認められたもので、局方品においても非同等の問題が認識された例であるといえる。

後発医薬品の品質に対する関心から、医療機関で医療の担い手として独自に製剤試験等で品質の確認を実施する場合も多々あると思われる。今後の対策として、問題があると思われる事例が見いだされた場合には、速やかな情報交換により、適切な対応を講じていけるようなシステム作りが望ましいのではと考えられる。

## 5. 後発医薬品を安心して使うためのさらなる課題

後発医薬品のガイドラインに従って申請された後発医薬品では、同等性は担保されていると考えられ、ガイドライン以前にすでに承認されていた後発医薬品では、溶出試験の活用による品質再評価が終了したもの、すなわちオレンジブックでステップ5に達している製剤においては、代替え調剤により非同等の問題が起こる可能性はほとんどないと思われる。しかし、後発医薬品には、すでに上述したことも含めて、以下のような問題がまだ残されており、今後のさらなる対応が必要である。

①溶出試験による再評価が困難であるとされたために、再評価対象から外れた後発医薬品や、もともと品質再評価の対象となっていなかった医薬品については、今後の

対応が必要となる。なお、局方品については、現在、対応が計画されようとしている。

②承認後の市販製剤の品質確保をより確実にするためには、後発医薬品のみならず先発医薬品に関しても、スケールアップ時やロット変更時にも、適切に4液性等における溶出挙動を確認すること等を明確にしたGMP上のシステム整備を進めることが望ましい。

③最後に、平成14年の医療制度改定により、医薬品の処方日数の上限がほぼ撤廃され、病院では60日、診療所では30日処方が増えていく傾向があるといわれている。今のところ、市販後の医薬品の安定性は、包装の開封後は必ずしも担保されていない。今後、後発医薬品についても、包装を外した状態での過酷安定性試験を課し、処方後(例えばPTPシート状態)の安定性や品質保証にも考慮していく必要があるのではないかとと思われる。

## おわりに

健康保険制度の破綻を防ぐための医療費抑制の流れの中で、「ジェネリック医薬品」は、国やメーカーの啓蒙活動を経て、広く日常用語に仲間入りした。今後、その役割も責任も急速に拡大していくと思われるが、適切な後発医薬品の評価の継続と、その情報のできるかぎりの開示と周知が、安心できる医療と「ジェネリック医薬品」の成長を支える基盤になるものと考えている。

## 参考文献

- 1) 厚生労働省ホームページに掲載：  
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/sinryo/tyosa04/dl/data.pdf>
- 2) 青柳伸男：医薬品研究，28，355-369(1997)
- 3) 青柳伸男：医薬ジャーナル，39，66-70(2003)
- 4) 青柳伸男：医療，56，457-460(2002)
- 5) 溶出試験検討班の地方衛生研究所：埼玉県衛生研究所，東京都健康安全研究センター，神奈川県衛生研究所，静岡県環境衛生科学研究所，富山県薬事研究所，愛知県衛生研究所，京都府保健環境研究所，兵庫県立健康環境科学研究所，福岡県保健環境研究所
- 6) 平成17年8月8日，厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡，品質再評価に伴う難溶性薬物の具体的な処理手順について
- 7) 小川多津子，石田規子，問田有香，内田享弘，松山賢治：日病薬誌，38，47-50(2002)
- 8) 千葉健史，平船寛彦，和久井研至，嶋崎淳，岩渕修，宮手義和，高橋勝雄：医学と薬学，61-65(2005)
- 9) 近藤幸男，丸山一雄，滝沢知子，奥田宗一郎，高原将司，宇田川悟史：日病薬誌，41，1241-1243(2005)
- 10) 門脇祐子，中山大輔，佐久間信至，山下伸二，医学と薬学，54，189-196(2005)
- 11) 金本賢枝，小西廣巳，蓑内徳蔵，山路昭，日病薬誌，37，61-63(2001)
- 12) H. Konishi, K. Kanemoto, Y. Ikuno, T. Minouchi, T. Inoue, K. Hodohara, Y. Fujiyama, and A. Yamaji : Yakugakuzasshi, 122, 813-817(2002)



# Inhibition of Mannitol Crystallization in Frozen Solutions by Sodium Phosphates and Citrates

Ken-ichi IZUTSU,\* Chikako YOMOTA, and Nobuo AOYAGI

National Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.

Received November 10, 2006; accepted January 15, 2007; published online January 19, 2007

Effects of co-solutes on the physical property of mannitol and sorbitol in frozen solutions and freeze-dried solids were studied as a model of controlling component crystallinity in pharmaceutical formulations. A frozen mannitol solution (500 mM) showed a eutectic crystallization exotherm at  $-22.8^{\circ}\text{C}$ , whereas sorbitol remained amorphous in the freeze-concentrated fraction in the thermal scan. Various inorganic salts reduced the eutectic mannitol crystallization peak. Trisodium and tripotassium phosphates or citrates prevented the mannitol crystallization at much lower concentrations than other salts. They also raised transition temperatures of the frozen mannitol and sorbitol solutions ( $T_g'$ : glass transition temperature of maximally freeze-concentrated amorphous phase). Crystallization of some salts (e.g., NaCl) induced crystallization of mannitol at above certain salt concentration ratios. Thermal and near-infrared analyses of cooled-melt amorphous sorbitol solids indicated increased intermolecular hydrogen-bonding in the presence of trisodium phosphate. The sodium phosphates and citrates should prevent crystallization of mannitol in frozen solutions and freeze-dried solids by the intense hydrogen-bonding and reduced molecular mobility in the amorphous phase.

**Key words** amorphous; crystallization; formulation; freeze-drying; thermal analysis

Active ingredients and excipients in pharmaceutical solid formulations are in the amorphous or crystalline states. Application of amorphous solids is receiving increasing attention because of the unique physical and functional properties (e.g., higher dissolution rate, stabilization of freeze-dried proteins).<sup>1-4</sup> Controlling the component crystallinity through optimizing the compositions and the manufacturing process (freeze-drying, quench cooling of hot-melt liquids) is a relevant method in formulation development because each ingredient and excipient possess different intrinsic propensity for crystallization.<sup>5-7</sup> Freeze-drying with a large amount of "inert" nonionic molecules (e.g., disaccharides, soluble polymers) that are likely to form amorphous solid, is a popular way to obtain the intrinsically crystallizing ingredient in the non-crystalline dispersed state. The method, however, has some limitations in terms of the applicable excipients and the physical properties of the resulting solids.<sup>8</sup> Various inorganic salts also prevent crystallization of other solutes in frozen solutions and freeze-drying processes through mixing and/or complex formation.<sup>9-11</sup>

Mannitol is a popular excipient that tends to crystallize in frozen aqueous solutions.<sup>12</sup> The superior cake appearance and physical stability of the crystalline freeze-dried solids make mannitol a good bulking agent for many parenteral formulations of low-molecular-weight pharmaceuticals. The crystallization process of mannitol in frozen solutions, the resulting crystal polymorphs, and the effect of co-solutes on the physical properties have been studied extensively as models to elucidate the component crystallization process in multi-solute systems.<sup>13-19</sup> Co-lyophilization with sucrose prevents crystallization of mannitol during freeze-drying at sucrose/mannitol weight concentration ratios above 2-3.<sup>8,20,21</sup> Some salts (e.g., NaCl) that possess high melt miscibility with mannitol prevent its crystallization in frozen solutions at much lower concentrations than sucrose, whereas the low transition temperatures ( $T_g'$ : glass transition temperature of the maximally freeze-concentrated amorphous phase) of

the frozen solutions make it difficult to freeze-dry without physical collapse.<sup>9,12,22</sup>

Reduction of molecular mobility in the freeze-concentrated phase is another approach to obtain amorphous freeze-dried solids. Some salts (e.g., sodium tetraborate, boric acid) that effectively raise  $T_g'$ s of frozen polyol solutions (e.g., saccharides, sugar alcohols) by complex formation would prevent spatial rearrangement of the mannitol molecules required for crystallization.<sup>23-25</sup> Recent studies showed that some pH-adjusting excipients (e.g., sodium phosphate buffer) also raise glass transition temperature ( $T_g'$ ) of amorphous freeze-dried saccharides.<sup>26,27</sup> Some phosphate salts also prevent crystallization of mannitol during freeze-drying processes, suggesting contribution of the reduced molecular mobility in the amorphous mixture.<sup>3,22,28</sup> The purpose of this study was to elucidate the effect of phosphate and citrate salts on the physical properties of mannitol and sorbitol in the frozen aqueous solutions and in the dried solids. Different intrinsic tendency of mannitol and its isomer (sorbitol) for crystallization provided information on the mechanisms and requirements to obtain the stable amorphous solids. Controlling the component crystallinity by the widely used excipients should be of practical importance in developing formulations without particular safety concerns.

## Experimental

**Materials** All the proteins and other chemicals employed in this study were of analytical grade and obtained from the following commercial sources: sucrose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.); trisodium phosphate  $\cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Katayama Chemical, Osaka, Japan); disodium hydrogen citrate and sodium dihydrogen citrate (Kanto Chemical, Tokyo, Japan); D(+)-mannitol, D-sorbitol, and other chemicals (Wako Pure Chemical, Osaka).

**Freeze-Drying and Preparation of Amorphous Solids** Aqueous solutions (250  $\mu\text{l}$ ) containing 500 mM mannitol and various concentrations of co-solutes in flat-bottom glass vials (10 mm diameter) were lyophilized using a freeze-drier (Freezevac 1C; Tozai Tsusho, Tokyo). The solutions were frozen by immersion in liquid nitrogen, transferred to the shelf of the freeze-dryer, and lyophilized without a shelf temperature control for 12 h and at  $35^{\circ}\text{C}$  for 4 h. The solids were applied for the thermal analysis within 48 h of the preparation. Mixed powders containing sorbitol (approx. 200 mg), salt, and

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: Izutsu@nihs.go.jp



aliquot of water (50  $\mu$ l) in crystal cuvettes or glass tubes were heated under vacuum at 160  $^{\circ}$ C for 20 min using a drying oven (DP23, Yamato Scientific Inc., Tokyo), then cooled at room temperature to prepare amorphous solids for thermal and spectroscopic analyses.

**Thermal Analysis** Thermal analyses of frozen solutions and freeze-dried solids were performed using a differential scanning calorimeter (DSC-Q10; TA Instruments, New Castle, DE, U.S.A.) with an electric refrigerating system and associated software (Universal Analysis). Indium and cyclohexane were used for the DSC calibration. Aliquots of solutions (10  $\mu$ l) in aluminum cells were scanned from  $-70^{\circ}$ C at  $5^{\circ}$ C/min after the system had been cooled at  $-10^{\circ}$ C/min to study the thermal profile of the frozen solutions. The effect of a heat treatment (annealing) on the thermal properties of the frozen solutions was studied after the initial heating scan was paused at  $-10^{\circ}$ C, and then the samples were maintained at the temperature for 30 min. Thermal data were acquired in the subsequent heating scan from  $-70^{\circ}$ C at  $5^{\circ}$ C/min. The extent of mannitol crystallization exotherm was obtained from the peak area under the baseline of the heat flow. Peaks in the derivative thermograms were assigned to glass transition temperatures of the maximally freeze-concentrated amorphous phases ( $T'_g$ 's). Thermal analyses of the freeze-dried solids (1.7–2.2 mg) were performed from  $-30^{\circ}$ C at  $10^{\circ}$ C/min. The cooled-melt solids (approx. 5 mg) were scanned from  $-30^{\circ}$ C at  $5^{\circ}$ C/min.

**Near-Infrared Spectroscopy** Near-infrared analysis was performed using a FT-NIR system (MPA, Bruker Optik GmbH, Germany) with OPUS software. Absorbance of the sample (1-mm light path length) at 4000 to 12000  $\text{cm}^{-1}$  range was obtained at room temperature ( $25^{\circ}$ C) with a  $2\text{ cm}^{-1}$  resolution in 128 scans.

## Results

Figure 1 shows thermograms of frozen solutions containing an identical concentration (500 mM) of various solutes. Frozen citric acid and sodium citrate solutions showed ther-

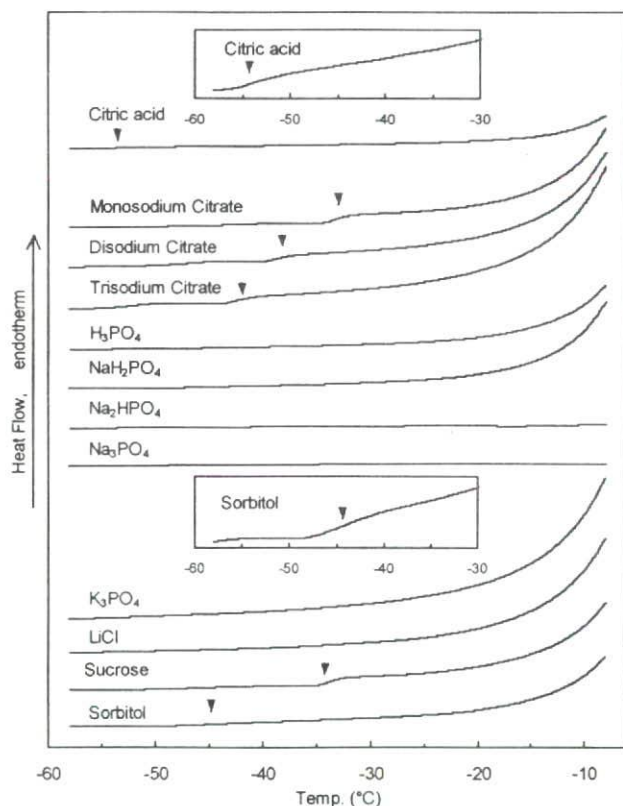


Fig. 1. Thermal Profiles of Frozen Single-Solute Aqueous Solutions (500 mM, 10  $\mu$ l) Scanned from  $-70^{\circ}$ C at  $5^{\circ}$ C/min

Glass transition temperatures of the maximally freeze-concentrated amorphous phases ( $T'_g$ 's) are marked with reversed triangles ( $\blacktriangledown$ ).

mograms typical for amorphous supercooled freeze-concentrated phase, with the baseline shifts ( $T'_g$ ) at  $-53.4^{\circ}$ C (citric acid),  $-33.4^{\circ}$ C (sodium dihydrogen citrate),  $-38.8^{\circ}$ C (disodium hydrogen citrate), and  $-42.5^{\circ}$ C (trisodium citrate).<sup>29</sup> The transitions ( $T'_g$ 's) of frozen sucrose and sorbitol solutions were observed at  $-33.8^{\circ}$ C and  $-44.2^{\circ}$ C, respectively. Some other frozen solutions (500 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{LiCl}$ ) showed a gradual shift of the thermogram baseline that suggested an amorphous freeze-concentrated phase with  $T'_g$  below  $-55^{\circ}$ C. Freezing of aqueous solutions containing di- and trisodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) solutions showed endotherm peaks in the cooling process (data not shown) and flat thermograms in the heating scan, indicating that the salt crystallization was completed before the heating scan.<sup>5,30</sup> Some frozen salt solutions showed endotherm peaks that indicated eutectic crystal melting at  $-19.8^{\circ}$ C ( $\text{NaCl}$ ),  $-8.9^{\circ}$ C ( $\text{KCl}$ ), and  $-14.2^{\circ}$ C ( $\text{RbCl}$ ) (data not shown). The peak temperatures were slightly (approx.  $2^{\circ}$ C) higher than the values in some literature probably because of the higher scanning rate in this study.<sup>5,6,31</sup>

Figure 2 shows DSC scans of frozen solutions containing 500 mM mannitol (approx. 91.1 mg/ml) and varied concentrations of sodium hydrogen phosphates ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) in the first heating scan from  $-70^{\circ}$ C, and in the second heating scan after a heat treatment (annealing) at  $-10^{\circ}$ C for 30 min. The frozen mannitol solution showed a large eutectic crystallization exotherm peak at  $-22.8^{\circ}$ C in the first scan. Several smaller thermal events, including two possible  $T'_g$ 's ( $T'_{g1}$ :  $-37.5^{\circ}$ C,  $T'_{g2}$ :  $-29.0^{\circ}$ C) and a small endotherm ( $-24.3^{\circ}$ C), were also observed prior to the crystallization exotherm.<sup>17,21,28</sup> A small exotherm peak that suggests partial crystallization was observed in the cooling process of some frozen mannitol solutions (data not shown). The second scan of the frozen mannitol solution after the

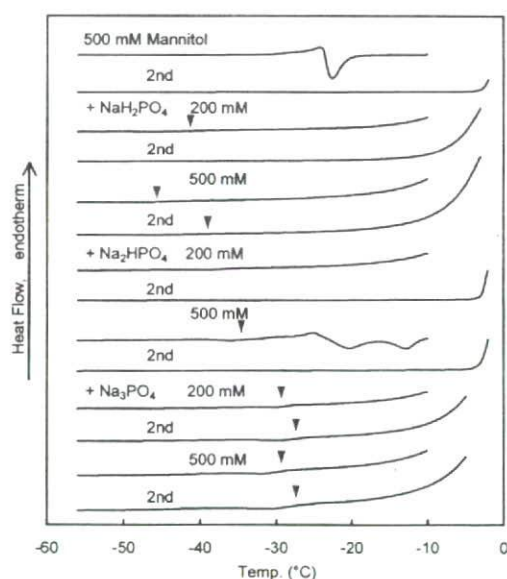


Fig. 2. Thermal Profiles of Frozen Solutions Containing Mannitol (500 mM) and Varied Concentrations of Sodium Phosphates in the First Scan from  $-70^{\circ}$ C at  $5^{\circ}$ C/min (Upper) and the Second Scan after a Heat Treatment at  $-10^{\circ}$ C for 30 min

The glass transitions ( $T'_g$ 's) are marked with reversed triangles ( $\blacktriangledown$ ).



heat treatment resulted in a flat thermogram up to the ice-melting temperature, indicating the crystallized mannitol in the frozen solution.

The phosphate salts showed varied effects on the thermal property of the frozen mannitol solution. The mannitol crystallization exotherm peak disappeared in the presence of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (200, 500 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (200 mM) or  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (200, 500 mM), presenting a thermal transition ( $T'_g$ ) that indicated the amorphous freeze-concentrated phase surrounding ice crystals. The frozen solution containing 500 mM mannitol and 500 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  showed two exotherm peaks that suggest crystallization of mannitol ( $-20.3^\circ\text{C}$ ) and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $-12.8^\circ\text{C}$ ). The second scan of frozen solutions containing mannitol and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (500 mM) or  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (200, 500 mM) also showed the  $T'_g$  transitions. A slight shift of the transition temperature ( $T'_g$ ) in the second scan suggested retention of the amorphous freeze-concentrated phase and some re-ordering (e.g., further ice crystal growth) of the frozen solution during the heat treatment.<sup>17)</sup> The second scan of frozen solutions containing mannitol and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (200, 500 mM) showed flat thermograms up to the ice-melting temperature, indicating the crystallized mannitol and the salt.<sup>18)</sup>

Figures 3 and 4 show effects of various co-solutes (e.g., phosphate, citrate, chloride salts) on the mannitol crystallization exotherm size and transition temperatures ( $T'_g$ 's) of the frozen solutions. The crystallization exotherm of the frozen mannitol solution (500 mM) was  $14.1 \pm 1.2 \text{ J/g}$  ( $n=3$ ). Most of

the solutes, except  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , apparently reduced the mannitol crystallization peak concomitantly with the upward shift of the peak temperature. Alkali-metal chloride salts with smaller cations ( $\text{LiCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ) were more effective at reducing the mannitol crystallization peak than those with larger cations ( $\text{KCl}$ ,  $\text{RbCl}$ ). The mannitol crystallization peak also disappeared in the presence of 200 mM sucrose or 150 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , indicating the prominent effect of the salts, especially compared in their weight concentrations. Addition of some solutes slightly increased the exotherm at lower concentrations ( $<100 \text{ mM}$ ), probably because they alter thermal transitions prior to the crystallization peak. Sodium and potassium phosphates showed varied ability to reduce the mannitol crystallization peak depending on the ionic valencies. The mannitol crystallization peak disappeared at different phosphate salt concentrations ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4 < \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 < \text{NaH}_2\text{PO}_4 < \text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Sodium phosphate buffers containing both  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  at different concentration ratios (3:1, 1:1, and 1:3) showed the crystallization-preventing effects intermediate between those of the individual salt solutions (data not shown). The mannitol crystallization peak also disappeared at different sodium citrate and citric acid concentrations (trisodium citrate < disodium citrate < monosodium citrate < citric acid). The pronounced effect of tri- and divalent salts suggests the significance of ion concentrations or alkaline pH on the ability of co-solutes to prevent the mannitol crystallization. The mannitol crystallization peak re-appeared upon further addition of some salts (300–500 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 500 mM  $\text{RbCl}$ ,

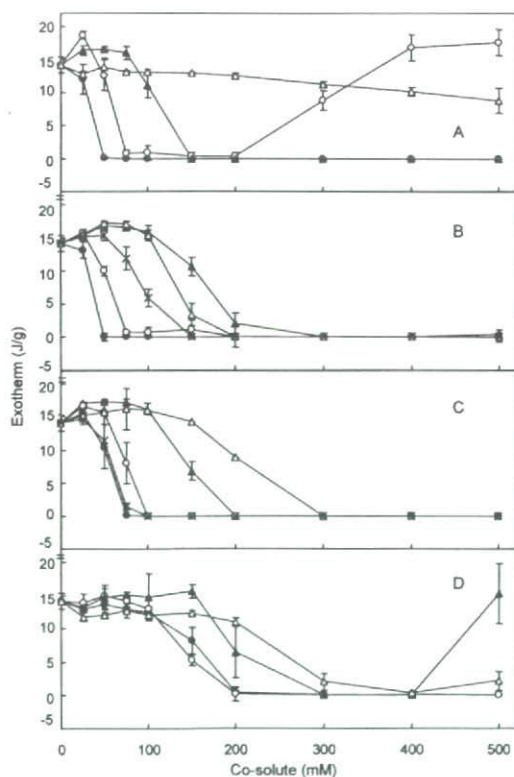


Fig. 3. Effects of Co-solutes on the Mannitol Crystallization Exotherm in Frozen Aqueous Solutions ( $10 \mu\text{l}$ ) Scanned from  $-70^\circ\text{C}$  at  $5^\circ\text{C}/\text{min}$

The symbols denote frozen solutions containing (A) ●:  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , ○:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , ▲:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , △:  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , (B) ●:  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , ○:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , ▲:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , △: sucrose, ×:  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , (C) ●: trisodium citrate, ○: disodium citrate, ▲: monosodium citrate, △: citric acid, ×: tripotassium citrate, (D) ●:  $\text{LiCl}$ , ○:  $\text{NaCl}$ , ▲:  $\text{KCl}$ , △:  $\text{RbCl}$  (mean value  $\pm$  S.D.,  $n=3$ ).

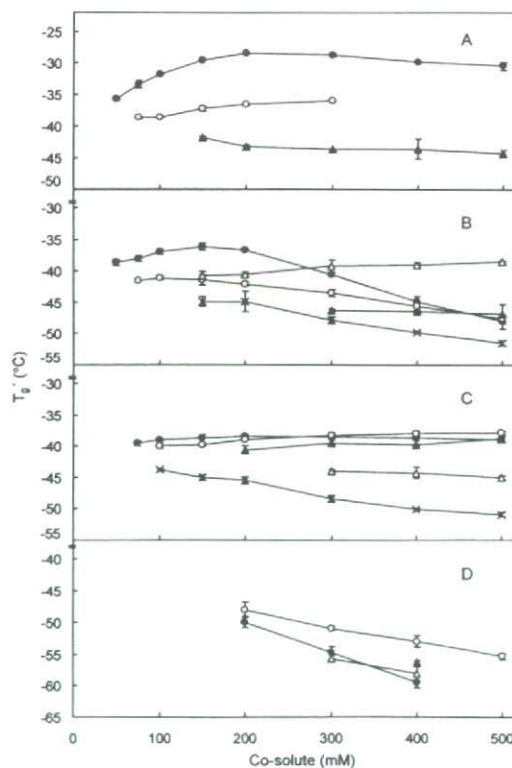


Fig. 4. Thermal Transition Temperatures ( $T'_g$ : Glass Transition of the Maximally Freeze-Concentrated Amorphous Phases) of the Frozen Solutions ( $10 \mu\text{l}$ ) Containing Mannitol (500 mM) and Various Concentrations of Co-solutes Scanned from  $-70^\circ\text{C}$  at  $5^\circ\text{C}/\text{min}$

Symbols denote the co-solutes shown in Fig. 3 (mean value  $\pm$  S.D.,  $n=3$ ).



500 mM KCl). Crystallization of these salts in the single-solute frozen solutions (Fig. 1) suggested that the salt crystallization at high salt/mannitol ratio induced the mannitol crystallization in the remaining phase.

Frozen solutions containing the amorphous state mannitol and co-solute combinations showed apparent  $T'_g$  transition (Fig. 4). Extrapolating the transition temperatures of these mixture solutions suggested that  $T'_g$  of the frozen single-solute mannitol solution occurred at approximately  $-40^\circ\text{C}$ , which should correspond to the reported lower-temperature transition ( $T'_{g1}$ ).<sup>21,28</sup> Addition of some salts (e.g.,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{RbCl}$ ) lowered the transition temperature linearly depending on their concentrations. Sucrose slightly shifted the transition toward its intrinsic  $T'_g$  ( $-33.8^\circ\text{C}$ , Fig. 1).<sup>21</sup> These findings suggest simple mixing of the solutes in the freeze-concentrated phase, which transition temperature depends on the  $T'_g$ 's of the individual components and their concentration ratios. In contrast, some phosphate and citrate salts non-linearly raised the transition temperature. Frozen solutions containing mannitol and trisodium or tripotassium salts ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , trisodium citrate) showed the highest transition temperatures at certain (150–300 mM) co-solute concentrations. The transition temperatures above those of the individual solutes (e.g., trisodium citrate:  $-42.5^\circ\text{C}$ ) suggested reduced molecular mobility in the freeze-concentrated phase.

Sorbitol remained amorphous in the single-solute (500 mM) frozen solution, presenting a  $T'_g$  transition at  $-44.2^\circ\text{C}$  (Fig. 1). Effect of the salts on the transition temperature of the frozen sorbitol solution ( $T'_g$ , Fig. 5) showed similar trends with the mannitol-salt systems. The non-linear upward shift of  $T'_g$ 's suggested some interaction between the  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  and the sugar alcohols, or altered environment in the freeze-concentrated phase. A salt crystallization exotherm peak was observed in the solutions containing 500 mM sorbitol and 300–500 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Addition of 500 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  resulted in low  $T'_g$  ( $-45.0^\circ\text{C}$ ) that suggested transition of phase-separated sorbitol fraction.

Effects of sodium phosphates and citrates on the physical properties of freeze-dried mannitol was studied (Fig. 6). Freeze-drying of mannitol resulted in  $\alpha$  or  $\beta$  polymorph crystal that showed a large crystal melting endotherm at approximately  $170^\circ\text{C}$ .<sup>18,32</sup> Co-lyophilization with the phosphate and citrate salts resulted in the small crystal melting peaks that suggested lower crystallinity or different polymorph (e.g.,  $\delta$ -form) in the solid.<sup>9,18,32</sup> Some solids showed glass transitions ( $35$ – $55^\circ\text{C}$ ), exotherm peaks of putative mannitol crystallization ( $60$ – $80^\circ\text{C}$ ), and small mannitol crystal melting peaks ( $150$ – $170^\circ\text{C}$ ). Transition temperatures ( $T_g$ 's) of these co-lyophilized solids were higher than the reported  $T_g$  of amorphous mannitol (approx.  $13^\circ\text{C}$ ).<sup>33</sup> Freeze-dried solids containing mannitol and trisodium phosphate or citrate showed  $T_g$ 's ( $52.9$ ,  $43.7^\circ\text{C}$ ) higher than those of the corresponding disodium salts ( $44.5$ ,  $40.0^\circ\text{C}$ ). Co-lyophilization with a higher concentration (200 mM) of the co-solutes further reduced the mannitol crystallization during the process (data not shown). The upper shift of the glass transition temperature ( $T_g$ ) suggested altered interaction (e.g., hydrogen-bonding) between mannitol molecules, as was reported in co-lyophilization of disaccharides with the phosphate salts.<sup>26</sup>

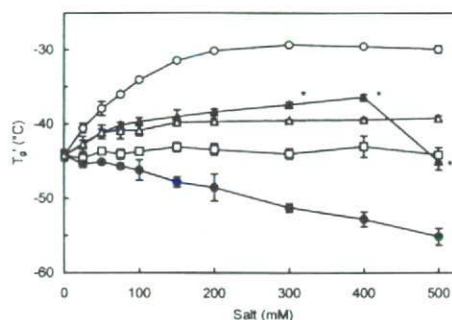


Fig. 5. Effect of Co-solutes on  $T'_g$  of Frozen Sorbitol (500 mM) Solutions

An aliquot of solution ( $10\ \mu\text{l}$ ) in aluminum cell was scanned from  $-70^\circ\text{C}$  at  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ . Symbols represent measured midpoint values  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ,  $\circ$ :  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,  $\blacktriangle$ :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\triangle$ : trisodium citrate,  $\square$ :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\bullet$ :  $\text{NaCl}$ ).

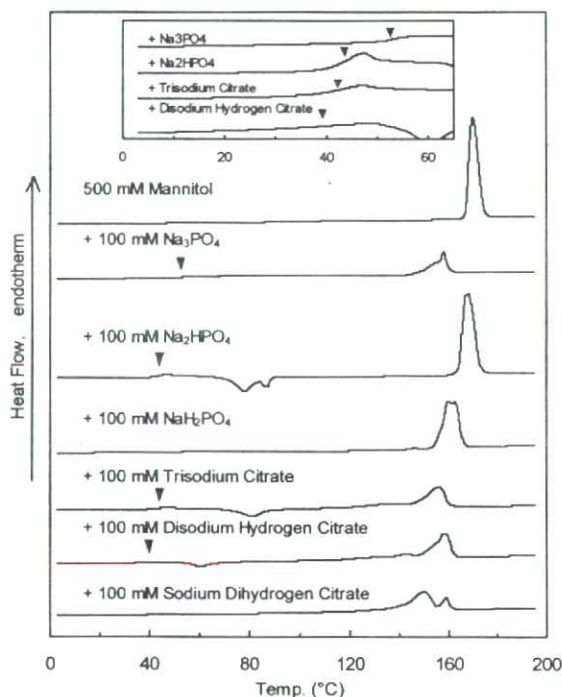


Fig. 6. Thermal Profiles of Freeze-Dried Solids Obtained from Initial Solutions Containing Mannitol (500 mM) and Various Co-solutes (100 mM)

Some thermograms were magnified to indicate the glass transition temperatures of the solids ( $\nabla$ ).

Thermal and near-infrared analyses of cooled-melt amorphous sorbitol solids were performed to study the possible salt-induced changes in molecular interactions. A thermogram of cooled-melt sorbitol solid, and effects of the salts on the glass transition temperature ( $T_g$ :  $-1.1^\circ\text{C}$ ) are shown in Fig. 7. The amorphous sorbitol solid showed only a glass transition in the thermal scan up to  $125^\circ\text{C}$ . Trisodium phosphate and citrate exhibited much larger effect to raise the  $T_g$  of the amorphous sorbitol solid than  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and  $\text{NaCl}$ , suggesting significant reduction in the molecular mobility. Near-infrared spectra of the cooled-melt amorphous sorbitol solid showed several broad bands that indicate random molecular configurations (Fig. 8). The bands in the  $6000$  to  $7000\ \text{cm}^{-1}$  range have been assigned as O–H stretch first overtones of hydroxyl groups with intermolecular (around  $6350\ \text{cm}^{-1}$ ) and intramolecular (around  $6800\ \text{cm}^{-1}$ ) hydro-



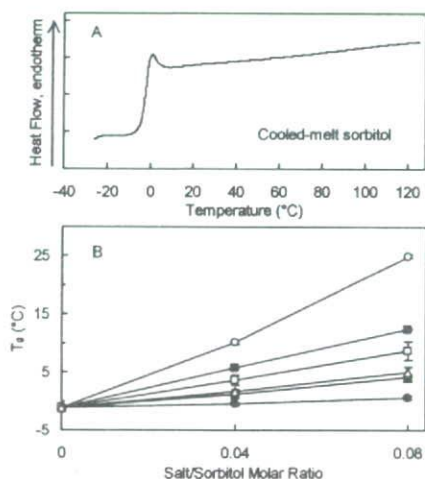


Fig. 7. Thermal Profile (A) and Glass Transition Temperatures (B) of Cooled-Melt Sorbitol-Salt Mixture Solids

Symbols represent measured midpoint  $T_g$  values  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ,  $\circ$ :  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,  $\blacktriangle$ :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\blacksquare$ : trisodium citrate,  $\square$ : disodium citrate,  $\triangle$ : monosodium citrate,  $\bullet$ : NaCl).

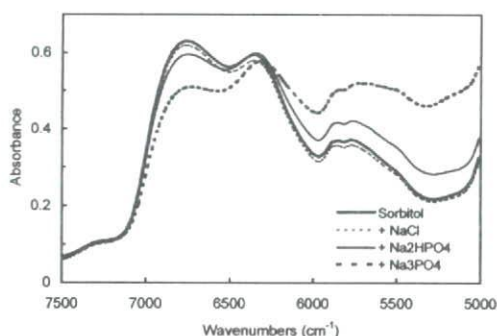


Fig. 8. Transmission Near-Infrared Spectra of Cooled-Melt Solids Containing Sorbitol and Salts ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , NaCl) in the Molar Ratio of 12.5:1

gen-bonding.<sup>34,35</sup> Addition of  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  reduced intensity of the band at  $6800\text{ cm}^{-1}$  with concomitant increase in the bands below  $6350\text{ cm}^{-1}$ , suggesting increased intermolecular hydrogen-bonding in the solid. The intense molecular interaction should result in the higher transition temperatures. Absorbance by the phosphate salts should also contribute to the increased intensity in the lower wavenumber region ( $5500\text{--}6000\text{ cm}^{-1}$ ).<sup>34,35</sup> Partial crystallization of cooled-melt mannitol made the solid inappropriate for the NIR study.

### Discussions

Various co-solutes, including popular excipients in pharmaceutical formulations, kinetically and/or thermodynamically prevented the crystallization of mannitol in frozen solutions at certain concentrations. Trisodium and tripotassium phosphates or citrates showed larger effect to prevent the mannitol crystallization in the frozen solutions and freeze-dried solids. The sorbitol and salt combinations indicated reduced mobility of molecules by intense hydrogen-bonding in the freeze-concentrated phase, which should contribute to retain mannitol in the amorphous state.

Miscibility of mannitol and co-solutes in the concentrated fraction should be the first requisite to prevent the mannitol

crystallization in frozen solutions. Mannitol and the various co-solutes were freeze-concentrated into the same phase at certain concentration ratios, and under this condition mixing should kinetically perturb the spatial rearrangement of mannitol molecules required for crystallization. Reported significant melt miscibility of mannitol and some salts (e.g., NaCl) at elevated temperatures suggested their thermodynamic compatibility in the concentrated mixture phase in frozen solutions.<sup>9</sup> On the other hand, thermodynamic solute immiscibility and/or co-solute crystallization (e.g.,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) at above their critical mixing co-solute/mannitol concentration ratios should separate the solutes to different phases in a frozen solution.<sup>36</sup> The co-solute crystallization should induce crystallization of the remaining mannitol molecules. Various factors, including the structure, ionized state and concentrations of co-solutes, as well as the thermal process, should determine the miscibility with mannitol in the frozen solutions.

Reduction of the molecular mobility of mannitol should be another significant requirement to prevent its crystallization in frozen solutions. The upward shift of the transition temperatures ( $T_g$ 's) in the presence of some phosphate and citrate salts should indicate the reduced molecular mobility in the freeze-concentrated phases. Some of the combinations showed their highest  $T_g$ 's at certain salt concentrations, which suggested direct interaction between mannitol and co-solute ions and/or altered molecular interactions between mannitol molecules rather than simple mixing.<sup>23,24</sup> It is plausible that the salt-induced intense intermolecular hydrogen-bonding observed in the cooled-melt sorbitol system also contributes to prevent mannitol crystallization in frozen solution and freeze-dried solids. The different effects of phosphate and citrate salts suggested that ionic valence and local pH are the significant factors involved in altering the molecular interactions. The effect of pH on the molecular interaction between polyols are subject to debate, and will require further study.<sup>26,37</sup>

### References

- Hancock B. C., Zografi G., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1—12 (1997).
- Craig D. Q., Royall P. G., Kett V. L., Hopton M. L., *Int. J. Pharm.*, **179**, 179—207 (1999).
- Izutsu K., Yoshioka S., Terao T., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 5—8 (1994).
- Pikal M. J., Dellerman K. M., Roy M. L., Riggan R. M., *Pharm. Res.*, **8**, 427—436 (1991).
- Chang B. S., Randall C., *Cryobiology*, **29**, 632—656 (1992).
- MacKenzie A. P., *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **278**, 167—189 (1971).
- Suzuki T., Franks F., *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **89**, 3283—3288 (1993).
- Kim A. I., Akers M. J., Nail S. L., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 931—935 (1998).
- Telang C., Suryanarayanan R., Yu L., *Pharm. Res.*, **20**, 1939—1945 (2003).
- Tong P., Taylor L. S., Zografi G., *Pharm. Res.*, **19**, 649—654 (2002).
- Izutsu K., Fujimaki Y., Kuwabara A., Aoyagi N., *Int. J. Pharm.*, **301**, 161—169 (2005).
- Nail S. L., Jiang S., Chongprasert S., Knopp S. A., *Pharm. Biotechnol.*, **14**, 281—360 (2002).
- Cannon A. J., Trappler E. H., *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **54**, 13—22 (2000).
- Yu L., Milton N., Groleau E. G., Mishra D. S., Vansickle R. E., *J. Pharm. Sci.*, **88**, 196—198 (1999).
- Lu Q., Zografi G., *Pharm. Res.*, **15**, 1202—1206 (1998).
- Williams N. A., Guglielmo J., *J. Parenter. Sci. Technol.*, **47**, 119—123 (1993).
- Pyne A., Surana R., Suryanarayanan R., *Pharm. Res.*, **19**, 901—908



- (2002).
- 18) Kett V. L., Fitzpatrick S., Cooper B., Craig D. Q., *J. Pharm. Sci.*, **92**, 1919—1929 (2003).
  - 19) Martini A., Kume S., Crivellente M., Artico R., *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **51**, 62—67 (1997).
  - 20) Johnson R. E., Kirchhoff C. F., Gaud H. T., *J. Pharm. Sci.*, **91**, 914—922 (2002).
  - 21) Lueckel B., Bodmer D., Helk B., Leuenberger H., *Pharm. Dev. Technol.*, **3**, 325—336 (1998).
  - 22) Telang C., Yu L., Suryanarayanan R., *Pharm. Res.*, **20**, 660—667 (2003).
  - 23) Miller D. P., Anderson R. E., de Pablo J. J., *Pharm. Res.*, **15**, 1215—1221 (1998).
  - 24) Izutsu K., Ocheda S. O., Aoyagi N., Kojima S., *Int. J. Pharm.*, **273**, 85—93 (2004).
  - 25) Yoshinari T., Forbes R. T., York P., Kawashima Y., *Int. J. Pharm.*, **258**, 109—120 (2003).
  - 26) Ohtake S., Schebor C., Palecek S. P., de Pablo J. J., *Pharm. Res.*, **21**, 1615—1621 (2004).
  - 27) Kets E. P. W., Ijpelaar P. J., Hoekstra F. A., Vromans H., *Cryobiology*, **48**, 46—54 (2004).
  - 28) Cavatur R. K., Vemuri N. M., Pyne A., Chrzan Z., Toledo-Velasquez D., Suryanarayanan R., *Pharm. Res.*, **19**, 894—900 (2002).
  - 29) Lu Q., Zografi G., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1374—1378 (1997).
  - 30) Murase N., Franks F., *Biophys. Chem.*, **34**, 293—300 (1989).
  - 31) Deluca P., Lachman L., *J. Pharm. Sci.*, **54**, 617—624 (1965).
  - 32) Burger A., Henck J. O., Hetz S., Rollinger J. M., Weissnicht A. A., Stottner H., *J. Pharm. Sci.*, **89**, 457—469 (2000).
  - 33) Yu L., Mishra D. S., Rigsbee D. R., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 774—777 (1998).
  - 34) Ozaki Y., Kawata S., "Near-Infrared Spectroscopy," Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1996.
  - 35) Shenk J. S., Workman J. J., Jr., Westerhaus M. O., "Handbook of Near-Infrared Analysis," ed. by Burns D. A., Ciurczak W. W., Taylor & Francis, New York, 2001, pp. 419—474.
  - 36) Randolph T. W., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1198—1203 (1997).
  - 37) Eriksson J. H., Hinrichs W. L., de Jong G. J., Somsen G. W., Frijlink H. W., *Pharm. Res.*, **20**, 1437—1443 (2003).



Short communication

## Determination of biotin following derivatization with 2-nitrophenylhydrazine by high-performance liquid chromatography with on-line UV detection and electrospray-ionization mass spectrometry

Chikako Yomota\*, Yukiko Ohnishi

*National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan*

Received 7 February 2006; received in revised form 13 December 2006; accepted 15 December 2006

Available online 21 December 2006

### Abstract

Currently, biotin is typically determined in Japan using a microbiological method. Such microbiological assays are sensitive, but they are not always highly specific and are also rather tedious and time-consuming. In the present study, RP-HPLC and LC-MS methods for the determination of biotin have been developed by derivatizing the carboxyl group with 2-nitrophenylhydrazine hydrochloride. 2-Nitrophenylhydrazine is used for the derivatization of carboxylic acids, and these derivatives are known to be applicable to LC-MS detection. Biotin in tablets were extracted by the addition of water and ultrasonic agitation. In order to clean up the sample solution, the filtrate was applied to an ODS cartridge and eluted with methanol. The conditions for preparing the 2-nitrophenylhydrazide derivatives were modified from a previous report for fatty acids. Good recovery rates of over 70% were obtained for the addition of 5–125  $\mu\text{g}$  of biotin per formulation. The detection limit in HPLC at 400 nm was 0.6 ng per injection, with good linearity being obtained over the concentration range 0.001–0.2  $\mu\text{g}$  per injection. Further, derivatives were determined by LC-MS with electrospray ionization, where the spectra indicated the molecular ions  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . The detection limit was 0.025 ng per injection in the selected ion monitoring analysis, and linearity was observed in the range of 0.6–6 ng per injection. The proposed method could be used to specifically determine the presence of biotin in relatively clean samples.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Biotin; 2-Nitrophenylhydrazine derivative; HPLC; LC-MS; Electro spray ionization

### 1. Introduction

Biotin (vitamin H) is a coenzyme essential in amino acid metabolism and in the maintenance of skin, hair and nerves. Low biotin intake has been reported to result in serious biochemical disorders, such as reduced carboxylase activity, inhibition of protein and RNA synthesis and reduced antibody production. In recent years, the interest in this vitamin has increased, mainly due to diseases such as multiple carboxylase deficiency, which can be successfully treated by biotin administration. A decrease in biotin status has been reported to occur in several population groups, such as pregnant women.

In Japan, in 2001, the nutritional requirement of 30  $\mu\text{g}$  of biotin per day was set for adults and 5  $\mu\text{g}$  for infants, with an additional requirement of 5  $\mu\text{g}$  for pregnant women. Three years

later, biotin was also approved as a food additive and now can be supplied as ingredient in food with nutrient function claims [1].

Diagnosis of biotin deficiency is crucial as well as the monitoring of biotin levels in biological fluids of patients receiving biotin treatment. It is also important to determine biotin levels in pharmaceutical preparations as well as in food and food supplement products, which constitute the main source of biotin for humans. For this reason, analytical methods have been developed, in order to determine biotin in biological fluids, as well as in various types of food products and pharmaceutical preparations containing biotin [2].

Biotin has long been determined by a microbiological method, which is tedious and time-consuming [3]. Recently, various HPLC methods have been described to improve the selectivity [4–9]. Using 4-bromomethylmethoxycoumarin [4], 9-anthryldiazomethane (ADAMS) [5,6], and 1-pyrenyldiazomethane (PDAM) [7] as pre-column reagents, biotin was derivatized and determined by fluorometric detection. However

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 1141; fax: +81 3 3707 6950.  
E-mail address: [yomota@nihs.go.jp](mailto:yomota@nihs.go.jp) (C. Yomota).



they are still inappropriate for common analysis, due to a lack of sensitivity or their complicated procedure or the many unknown peaks derived from reagents. Kamata et al. reported a method of applying electrochemical detection to determine biotin in multivitamin pharmaceutical preparations [8], and achieved a good separation. Further, biotin methylester was described as being well detected by MS detection in a positive ion chemical ionization mode [9]. Wolf et al., reported the quantification of biotin in human skin using LC-MS and resulted in the detection limit of 0.8 ng/mL [10]. Recently, LC-MS/MS analysis of biotin was also reported to be applicable to food samples with a biotin content over 100 µg/kg [11].

On the other hand, it was demonstrated in some reports that aliphatic acids and organic acids reacted selectively with 2-nitrophenylhydrazine hydrochloride (2-NPH-HCl), and produced derivatives that are UV detectable [12–15]. The main advantage of derivatization with hydrazines, using coupling reagent 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC-HCl), with respect to other derivatization reagents is that the reaction can be carried out under very mild conditions (weakly acidic medium at 60 °C) in an aqueous environment. Here, we report the reaction of 2-NPH-HCl for the determination of biotin in pharmaceutical products or food with nutrient function claims. For further improvement in detection specificity, LC-MS is also applied. As described by Saitoh and Gamoh [15], hydrazide derivatives of organic acids were successfully detected by LC-MS with electrospray ionization.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagent solutions

2-NPH-HCl (Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, Japan) solutions (0.02 M) were prepared by dissolving the reagent in water. A EDC-HCl (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) solution (0.25 M) was prepared by dissolving the reagent in methanol. A fresh working solution of EDC was prepared daily, by mixing with an equal part of a solution of 2% pyridine in ethanol. A potassium hydroxide solution (15%, w/v) in water was also prepared. All the reagent solutions were stable for at least 3 months when kept below 5 °C. Biotin was commercially available from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan). All other chemicals were of analytical-reagent grade, and solvents were of HPLC quality. The ultra-pure water used for sample preparation was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

### 2.2. Samples

Samples used for the recovery tests were typical commercial foods with nutrient function claims. One food was in the form of a tablet containing seven kinds of vitamin such as vitamin B<sub>1</sub> (6 mg/tablet), vitamin B<sub>2</sub> (5 mg/tablet), vitamin B<sub>6</sub> (5 mg/tablet), vitamin B<sub>12</sub> (5 mg/tablet), niacin (8 mg/tablet), pantothenic acid (12 mg), folic acid (0.2 mg/tablet), but not biotin. The other food was a drink containing vitamin C (1000 mg/250 mL) as a nutrient, but not biotin.

### 2.3. Sample preparation

Tablets were finely powdered, with an amount corresponding to 40–200 µg being accurately weighed and added to 10 mL of water. The solution was sonicated for 10 min and centrifuged for 5 min at 10,000 rpm, followed by further filtration using a membrane filter (0.2 µm; Dismic-25CS, Toyo Roshi Kaisha, Tokyo, Japan). The beverage was used without pretreatment or was diluted with water to contain between 4 and 20 µg/mL of biotin. A Sep-Pak Plus tC18ENV cartridge (Waters) was conditioned by successively passing methanol (5 mL), and 5 mM tetrabutylammonium bromide (TBA) solution (5 mL). Five mL of the sample solution was mixed with 1 mL of 5 mM TBA solution and loaded in the pre-conditioned cartridge. The cartridges were then washed with 5 mL of 5 mM TBA solution to remove matrix interference and the analyte was then eluted with 2 mL of methanol. The eluant was transferred to a 2 mL volumetric flask and brought to exactly 2 mL with additional methanol.

A 100 µL aliquot of methanol eluant was added to a screw vial containing 200 µL of 250 mM EDC-HCl solution and 200 µL of 2% pyridine solution. After the addition of 200 µL of 20 mM NPH-HCl solution, the mixture was heated at 25 °C for 10 min. To remove the interfering materials, 100 µL of 15% potassium hydroxide solution was added, and a mixture thus obtained was further heated at 60 °C for 10 min and then cooled. The resulting hydrazide mixture was injected directly into the HPLC and LC-MS systems.

## 3. Instruments

### 3.1. HPLC apparatus and conditions

HPLC analyses were performed on an LC-10 series (Shimadzu, Kyoto, Japan) liquid chromatography system equipped with two LC-10ADvp pumps, an SPD-10AVvp spectrophotometric detector, an SPD-M10Avp photodiode array detector, and a SIL-10ADvp autosampler. Data processing was carried out with a Class-VP LC workstation. For the reversed-phase column, an L-column ODS (250 × 4.6 mm, I.D., 5 µm) (Chemical Evaluation and Research, Tokyo, Japan) and a TSK guardgel ODS-80Ts (15 × 3.2 mm, I.D.) (Toso, Tokyo, Japan) were used. The detection wavelength was set at 400 nm and the column temperature was maintained at 40 °C. The mobile phase was the mixture of 20 mM potassium dihydrogenphosphate (pH 4.5) and acetonitrile (75:25), with a flow rate of 1 mL/min. Injection volume was 10 µL.

### 3.2. LC-MS

LC-MS measurements were carried out with an LC-10 series liquid chromatography system, coupled to a LC-MS-2010 mass spectrometer, equipped with an electro spray ionization source (ESI) (Shimadzu, Kyoto, Japan).

For the LC-ESI<sup>+</sup>-MS a split system 1/4 was used to introduce the effluent into the ES. The probe voltage was held at +1.5 kV and the cone voltage was set to 10 V. The block heater



temperature was 200 °C and CDL temperature was 250 °C. The nebulizing gas flow was 1.5 L/min and the pressure of drying gas was maintained at 0.2 mPa. Mass spectra were acquired by scanning from  $m/z$  100 to 500 and data were processed using software. The separation was performed in a Capcell Pak C18 UG120 (250 × 2 mm, I.D.) (Shiseido, Tokyo, Japan) under chromatographic conditions of: 0.1 ml/min flow-rate, 1 μl sample injection volume and a mixture of methanol and 5 mM ammonium acetate (1:1) as the mobile phase.

## 4. Results and discussion

### 4.1. Examination of derivatization conditions

Due to the weak chromophoric properties of biotin, resulting in relatively poor sensitivity and selectivity of detection, pre-column derivatization methods have been developed with HPLC, using the reagent 2-nitrophenylhydrazine hydrochloride (2-NPH·HCl) for the derivatization of carboxylic groups.

The reaction conditions were investigated following the reported method [12,13] in order to ensure the maximum derivatization of biotin. The structures of biotin and NPH ester of biotin were shown in Fig. 1. The condition of HPLC by UV detection was investigated following the method reported for the acid hydrazides of fatty acids [12]. The effect of the EDC·HCl concentration on the peak area was investigated, and there was little difference in HPLC peak area at 400 nm of products formed for EDC concentrations between 150 and 400 mM; therefore 250 mM of EDC·HCl was selected because it fell in the middle of this range. Peak area was not much affected by concentrations of pyridine from 1 to 4% (v/v). We selected 2% as a medium value within this wide range. The relationship between the peak area of the acid hydrazides and the concentration of 2-NPH·HCl showed little change between 15 and 30 mM, but concentrations greater than 40 mM showed a decrease in peak area.

The temperature of derivatization can be an important factor in the optimization process rate [12]; however, we found little difference in peak area between 20 and 30 °C after 10 min reaction time and as long as 50 min (Fig. 2). A higher temperature (60 °C) decreased peak area by approximately 20%. The peak area for biotin became more consistent after 10 min at 20–30 °C, which suggested that the derivatization was completed after 10 min. Thus, derivatization could be carried out at a room temperature of approximately 25 °C. The derivatives of biotin standard solutions were stable for at least 10 days when kept below 5 °C. However, the sample solutions purified from tablets through cartridges were often unstable. For example, the peak area decreased to 80% if purified sample solutions

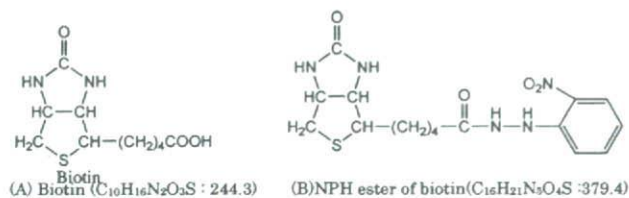


Fig. 1. Chemical structures of biotin (A) and NPH ester of biotin (B).

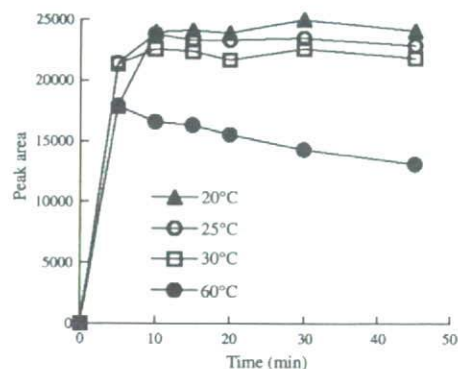


Fig. 2. Optimization of reaction time and reaction temperature for ester formation. A temperature of 25–50 °C had little effect on product formation between 10 and 50 min, whereas 60 °C reduced the total product formed by about 20%, and the reduction was greater with longer times.

stood for 3 h before derivatization. Therefore, the sample solutions should be converted immediately after preparation to the derivative.

### 4.2. HPLC separation and precision

Following the method described for the acid hydrazides of fatty acids [12], good chromatograms were obtained on reversed-phase columns using the mixture of 20 mM potassium dihydrogenphosphate (pH 4.5) and acetonitrile (75:25) as an eluent (Fig. 3A). The calibration curves were linear over the range 0.001–0.2 μg per injection (eight levels, three replicates, intercept; -691.56, slope; 41699,  $r = 0.999$ ) and the relative standard deviation of peak areas of 0.06 μg per injection ( $n = 6$ ) was 1.2%.

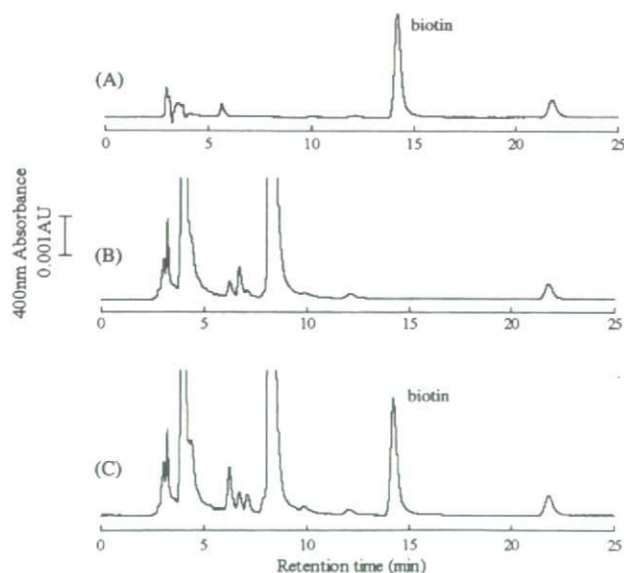


Fig. 3. HPLC chromatograms of tablet formulations: (A) standard solution of biotin NPH derivative (30 μg/mL), (B) tablet with no added biotin, (C) tablet with added biotin at 120 μg/tablet. Conditions: column, L-column (250 mm × 4.6 mm, I.D.); eluent, 20 mM potassium dihydrogenphosphate (pH 4.5) and acetonitrile (75:25); flow-rate, 1.0 mL/min; detection, UV at 400 nm; injection volume, 10 μL.

Table 1  
Recovery tests of biotin with HPLC ( $n = 6$ )

	Amounts of added biotin	Recovery (%)
Standard solutions	5 $\mu\text{g/ml}$	97.7 $\pm$ 1.4
	50 $\mu\text{g/ml}$	103.2 $\pm$ 2.3
Products		
Tablet	120 $\mu\text{g/tablet}$	93.0 $\pm$ 1.7
Drink	5 $\mu\text{g/ml}$	73.3 $\pm$ 2.1

With HPLC, the detection limit was calculated to be 0.6 ng per injection ( $S/N = 3$ ,  $n = 6$ ), on the basis of  $S/N$  ratios.

#### 4.3. Recovery test

Recovery testing was investigated using two products: a tablet and a drink, which contained several vitamins other than biotin. The results of recovery test were summarized in Table 1.

Satisfactory recoveries, ranging from 97.7 to 103.2%, were obtained when the whole procedure was performed at two levels of standard solutions, 5 and 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The recoveries from the tablet, using HPLC after adding 120  $\mu\text{g}$  biotin per tablet, are 93.0%. In the case of the drink, 73.3% was obtained when 5  $\mu\text{g}$  of biotin was added per mL of the drink. HPLC chromatograms obtained for the recovery test from the tablet are shown in Fig. 3. Fig. 3A is the chromatogram for the standard solution of biotin NPH derivative and Fig. 3B is that for the tablet with no added biotin. As shown in Fig. 3C, the peaks for biotin were well separated from other large peaks and the peaks derived from the reagents were not distinctly observed. In many other derivatization methods such as fluorometric detection, there is a difficulty to spend too long analytical time to elute completely the large reagent peaks after a biotin peak. In this analytical procedure, other carboxylic vitamins, such as nicotinic acid, pantothenic acid and folic acid, were also detected as their derivatives. Their retention times in the same chromatographic conditions as Fig. 3C were confirmed by injecting each standard solution separately to be 12.7 min for nicotinic acid, 4 and 8 min for pantothenic acid, 4 and 4.4 min for folic acid. Folic acid may produce two derivatives due to its two carboxylic residues. However, in case of pantothenic acid, the reason for elution in two peaks was not clear. In Fig. 3B and C, the large peaks near 4 and 8 min may be derived from pantothenic acid contained in tablets.

The precision of the method was validated by both intra-day and inter-day variances in the case of the recoveries from the tablet. To determine intra-day variance, the assays were carried out five times in a day. Inter-day variance was determined by analyzing the samples over three days. From these results, the repeatability was 1.5% and intermediate precision was 2.5%. The limit of quantification was 2  $\mu\text{g/mL}$  as the initial sample solutions before the step of purification by Sep-Pak cartridges.

#### 4.4. Confirmation test with LC-MS

In analyzing the sample solutions extracted from tablets by HPLC, sometimes the interference peak appeared near the biotin

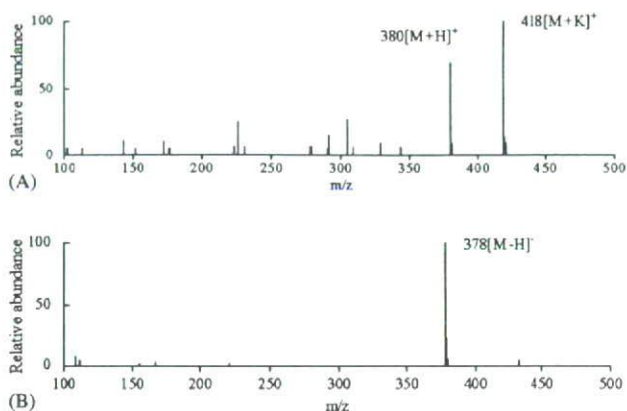


Fig. 4. LC-MS (ESI) spectra of NPH derivatives of biotin: (A) positive ion spectrum with molecular-related ions at  $m/z$  380 and the potassium-loaded ion at  $m/z$  418, (B) negative ion spectrum with the molecular-related ion at  $m/z$  378.

peak. Therefore, for a confirmation test, the MS detection was adopted. In the analysis of biotin derivatives by LC-MS, using ESI in both the positive and negative mode, a high sensitivity was achieved using the mobile phase of 5 mM ammonium acetate/methanol (1:1) solution. The positive and negative mass spectra of 2-NPH derivatives of biotin showed, not only molecular related ions ( $[M + H]^+$  ( $m/z$  380) and  $[M - H]^-$  ( $m/z$  378)), but also an  $m/z$  418, potassium-loaded ion in positive mode. (Fig. 4A and B). The calibration curves of the selected ion monitoring (SIM) chromatograms of  $[M + H]^+$  ( $m/z$  380), were linear over the range 0.6–6 ng per injection (six levels, three replicates, intercept; 12097, slope; 19735,  $r = 0.9996$ ) and the relative standard deviation of peak areas of 6 ng/injection ( $n = 6$ ) and also 0.6 g per injection ( $n = 6$ ) were less than 2%. The detection limit of biotin derivative in LC-MS was calculated to be 0.025 ng per injection ( $S/N = 3$ ,  $n = 6$ ). Applying the SIM chromatograms, acceptable recoveries of 97.5  $\pm$  3.2% ( $n = 6$ ) were obtained for tablets without any other peak. These results showed that 2-NPH derivatives of biotin can be well identified with ESI-MS detection.

## 5. Conclusion

Biotin can be selectively analyzed in an aqueous environment by derivatization with 2-NPH with UV-detection. Biotin derivatives can also be easily identified with LC-MS with ESI. From these results, this reaction appeared to be specific for the determination of as little as 0.6 ng of biotin, in the presence of large quantities of other substances. The proposed method could be used to specifically determine the presence of biotin in supplements and in pharmaceutical preparations.

## References

- [1] Japan Food Additives Association: Japan's Specifications and Standards for Food Additives, Tokyo, 2006.
- [2] Analytical Methods for Food Additives in Food, Nihon Shokuhin Eisei Kyoukai, Tokyo, 2000, p. 230.
- [3] E. Livaniou, D. Costopoulou, I. Vassiliadou, L. Leondiadis, J.O. Nyalala, D.S. Ithakissios, G.P. Evangelatos, J. Chromatogr. A 881 (2000) 331.



- [4] P.L. Desbene, S. Coustal, F. Frappier, *Anal. Biochem.* 128 (1983) 359.
- [5] Y. Kanazawa, T. Nakano, H. Tanaka, *NIPPON KAGAKU KAISHI* 3 (1984) 434.
- [6] K. Hayakawa, J. Oizumi, *J. Chromatogr.* 413 (1987) 247.
- [7] T. Yoshida, A. Uetake, C. Nakai, N. Nimura, T. Kinoshita, *J. Chromatogr.* 456 (1988) 421.
- [8] K. Kamata, T. Hagiwara, M. Takahashi, S. Uehara, K. Nakayama, K. Akiyama, *J. Chromatogr.* 356 (1986) 326.
- [9] M. Azoulay, P.L. Desbene, F. Frappier, *J. Chromatogr.* 303 (1984) 272.
- [10] R. Wolf, C. Huschka, K. Raith, W. Wohlab, R. Neubert, *Anal. Commun.* 34 (1997) 355.
- [11] U. Höller, F. Wachter, C. Wehrli, C. Fizet, *J. Chromatogr. B* 831 (2006) 8.
- [12] H. Miwa, C. Hiyama, M. Yamamoto, *J. Chromatogr.* 321 (1985) 165.
- [13] H. Miwa, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 365.
- [14] R. Peters, J. Hellenband, Y. Mengerink, A. Ven der Wal, *J. Chromatogr. A* 1031 (2004) 35.
- [15] H. Saitoh, K. Gamoh, *BUNSEKI KAGAKU* 52 (2003) 923.

PAT①

## 製剤開発段階でのPATの応用

## PAT Application in Developing Stage

日本PDA技術教育委員会 PAT検討会 研究開発段階研究班

田辺製薬株式会社・藤原尚登, 塩野義製薬株式会社・谷野忠嗣(リーダー),  
 アステラス製薬株式会社・谷 正樹, 株式会社パウレック・長門琢也,  
 エーザイ株式会社・中本敬三, 国立医薬品食品衛生研究所・藤巻康人,  
 大鵬薬品工業株式会社・山根賢治, 千代田化工建設株式会社・橋本葎人,  
 国立医薬品食品衛生研究所・檜山行雄

## はじめに

近年, FDAのガイダンスにより, わが国においてもPAT(Process Analytical Technology)がホットな話題となっている。その一方で, わが国では, すでに打錠機の圧力制御装置(PCD), 重量測定装置(WAC)や錠剤, カプセル, 顆粒の外観検査機など, 多くのPAT的工具が実用化されている。ただし, それらのほとんどは製造にフォーカスしたもので, 研究開発段階での活用例はほとんどないというのが実情である。

そこで, われわれ日本PDA技術教育委員会 PAT検討会 研究開発段階研究班では, 製品品質を造り込むという観点から, 頑健な製剤設計・製造設計に対し, PATが具体的にどのように機能するかを明らかにするということを目標に掲げ, 研究を行った。具体的には, 最終製品の溶出挙動に及ぼす造粒工程の影響度の大きさに注目し, 造粒状態をリアルタイムにモニタリングし, 最終製品の溶出挙動を予測することを目標とした。そして, 造粒状態の異なる造粒品につき, 非破壊で迅速分析が可能であることから欧米にてPATツールとして広く活用されている近赤外(NIR)を測定し, NIRスペクトルの変化との相関から造粒品の溶出速度の予測を試みた。

## 1. 実験

造粒工程(攪拌造粒)の条件を変化させ, 造粒状態の異なる造粒品を得るため, エテンザミドを主薬とする造粒品の試製を行った。処方および操作条件を表1に示す。

表1 処方および操作条件

処方	
エテンザミド(岩城製薬)	3,500g
乳糖(200M, HMS)	930g
コーンスターチ(日本食品化工)	395g
メチルセルロース (メトロゾスSM-15, 信越化学工業)	175g
(精製水)	(1,100g)
合計	5,000g
操作条件	
造粒装置(Vertical Granulator VG-25:パウレック)	
ブレード回転速度	120rpm, 240rpm, 480rpm, 590rpm
クロススクリー回転速度	3,000rpm
混合時間	2 min
造粒時間	5 min, 10min
整粒機(コーミル QC-197S:パウレック)	
インペラー回転速度	2,400rpm
スクリーン	φ 3
乾燥機(ヤマト科学)	
乾燥温度	50℃
乾燥時間	180min

試製方法としては, エテンザミド, 乳糖, コーンスターチおよびメチルセルロースを攪拌造粒装置に投入し, 2分間混合した後, クロススクリー回転速度(3,000rpm)を一定とし, ブレード回転速度を120rpm, 240rpm, 480rpmおよび590rpmと変化させ, 造粒を行った。精製水は, 一定速度にて造粒開始後40秒間で添加した。サンプリングは造粒開始5, 10分後に行った(590rpmの場合は, ブレード過負荷により造粒続行が困難と判断したため, 5分で終了した)。サンプリングした造粒品は, さらに整粒機を用い整粒し, 通風乾燥機にて乾燥した。

得られた造粒品, 整粒品および乾燥品について, 図1に示す各項目について評価を行った。なお, 溶出試験は, 溶出試験器(富山産業)を用い, 試験液を水900mLとし,



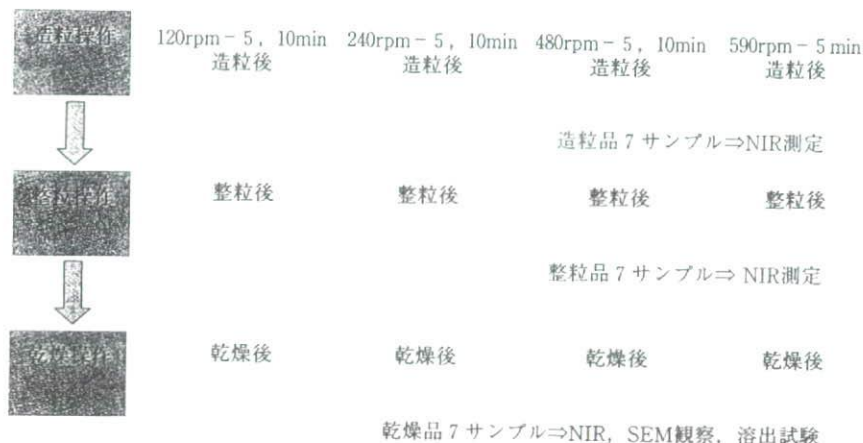


図1 評価項目

日本薬局方溶出試験法第2法(バドル法)により50rpmで実施した。

また、NIR分光装置はブルカー・オプティクス製“MPA”(分解能：4 cm<sup>-1</sup>，スキャン回数：32回)を用いた。対象サンプルが粉体のため専用バイアル(底面直径：2 cm，高さ：約5 cm)に移し、バイアル底面から近赤外光を照射する「拡散反射法(検出器：PbS)」によって測定を行った。測定は1サンプルにつき5回ずつ行い、代表サンプルデータを得るために、1回測定するごとに混合してからタッピングを行った。多変量解析にはブルカー・オプティクス製ケモメトリックスソフトウェア“OPUS”(Ver.5.0.3)を用いた。

## 2. 結果および考察

### (1) 溶出試験

乾燥品(7サンプル)の溶出試験結果は図2に示すとおりで、目的とする溶出速度の速い造粒品(120rpm：5および10分，240rpm：5分)と遅い造粒品(240rpm：10分，480rpm：5および10分)が得られていることが確認できた。なお，590rpm：5分の造粒品については，上記造粒品の中間的な溶出挙動を示した。この原因として，本造粒品の場合，造粒開始直後に凝集塊が形成され，凝集塊表面の圧密化が進行したが，凝集塊内部は圧密化が進行せず，整粒により凝集塊内部の圧密化が進行していない造粒品が現れたためと思われる。したがって，本サンプルについては，評価の対象外とすることとした。

以上のように，目的とする溶出速度の異なる造粒品が得られたため，それら溶出速度の差を溶出速度定数(k)を用いて数値化し，NIRスペクトルとの相関性を評価す

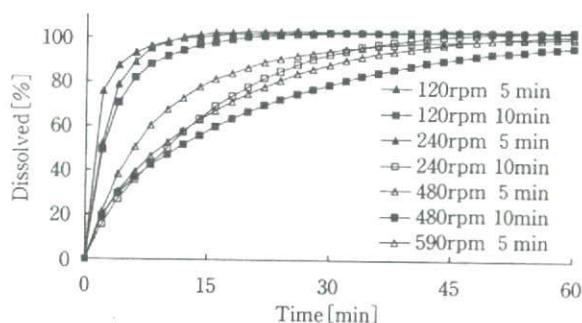


図2 溶出試験結果(水900mL，バドル法(50rpm))

表2 溶出速度定数(k)

造粒条件	120rpm 5分	120rpm 10分	240rpm 5分	240rpm 10分	480rpm 5分	480rpm 10分	590rpm 5分
溶出速度定数(k)	0.4409	0.2526	0.3788	0.0944	0.0803	0.0532	

ることとした(評価結果は「(4)溶出特性と近赤外スペクトルの相関解析」の項を参照)。溶出率の変化は直線的な変化でなく最大を100%とした漸近線に似た曲線を描くため(図2)，溶出試験の結果を式(1)，(2)によって総合的な溶出曲線に近似し，溶出曲線から溶出速度定数(k)を算出した。各サンプルの溶出速度定数(k)は表2に示すとおりである。

#### 溶出速度定数(k)の算出方法

$$dy/dt = k(100 - y) \dots \dots \dots (1)$$

(k：溶出速度定数，y：溶出率，t：時間  
また，0 ≤ y < 100とする)

初期条件 t = 0，y = 0 で変数分離して解くと以下のようになる。

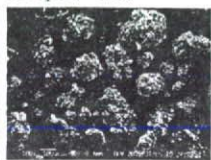
$$y = 100 - 100 \exp(-kt) \dots \dots \dots (2)$$

溶出：速い

120rpm, 5分



120rpm, 10分



240rpm, 5分



溶出：遅い

240rpm, 10分



480rpm, 5分



480rpm, 10分



図3 SEM写真

## (2)SEM写真

乾燥品(6サンプル)のSEM写真は、図3に示すとおりで、回転数の増加、造粒時間の延長により、粒子径や粒子の表面状態が若干変化していることが確認できた。しかしながら、それらの変化と溶出特性との相関は認められなかった。

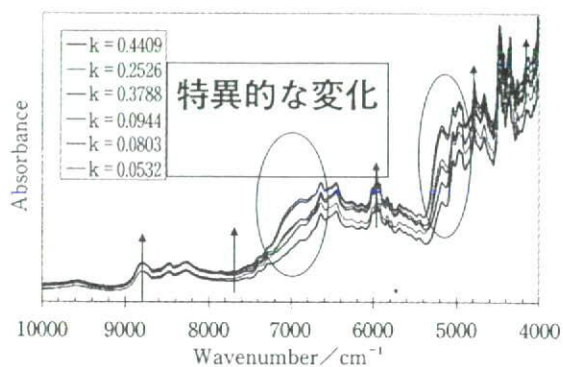


図4 近赤外スペクトル

## (3)近赤外スペクトル

造粒条件によって溶出速度が異なる原因を調査するため、乾燥品(6サンプル)のNIRスペクトルを測定した。その結果は図4に示すとおりで、溶出が遅い、つまり、溶出速度定数(k)が小さいサンプルのスペクトルは溶出が速い、つまり、溶出速度定数(k)が大きいサンプルのスペクトルに比べ、①全体的に吸光強度が上昇していること、②7000cm<sup>-1</sup>と5200cm<sup>-1</sup>付近の吸光強度が特異的



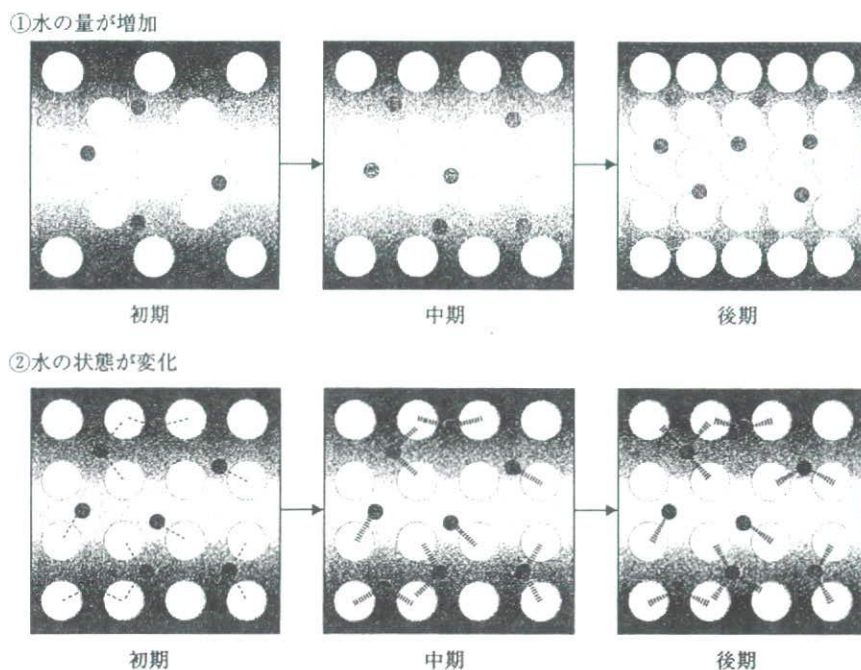


図5 造粒品中の薬物と水の存在モデル  
 ○：薬物および賦形剤粒子  
 ●：水  
 - -：相互作用

に変化していることが確認できた。①の全体的な吸光強度上昇の原因としては、SEM写真(図3)にて確認されたサンプル間の粒子径や粒子の表面状態などの物理的な差がNIRスペクトルに反映されたものと考えられた。しかし、②の $7000\text{cm}^{-1}$ と $5200\text{cm}^{-1}$ 付近の吸光強度の特異的な変化については、①のサンプル間の物理的な差だけでは説明がつかない。つまり、これら波数領域において、吸光強度の特異的な変化を引き起こしている何らかの要因があると考えられた。そこで、これら波数領域の帰属を調査した結果、水の第一倍音(約 $7000\text{cm}^{-1}$ )および結合音領域(約 $5200\text{cm}^{-1}$ )であることが確認できた。このことから、われわれ研究班では造粒品中の水の何らかの状態変化がNIRスペクトルに顕著に反映されるのではないかと考えた。

では、どのような水の状態変化が起こり、水の吸収帯が変化したのであろうか? その原因として、われわれは、①造粒の進行に伴い、造粒品の緻密さが増し、密度が増加、その結果、見かけ上、造粒品中の水の量が増加した、②時間の経過や回転数の増加とともに、何らかの相互作用(例えば、水素結合など)が働き、水の状態が変化し、倍音・結合音の遷移確率を増大させた、③①と②の組み合わせのいずれかではないか、と推定した。そして、これら近赤外スペクトルの解析から得られた知見を基に、造粒工程の時間経過に伴う造粒品中の水の状態変

化のイメージ図を考案した。イメージ図を図5に示す。

われわれ研究班では、以上のような造粒品中の水の状態変化がNIRスペクトルに顕著に反映されるのではないかと考えると同時に、そのような水の状態変化、造粒品の緻密さの変化が溶出の遅延に関連しているのではないかと推定した。そこで、各造粒品の溶出特性とNIRスペクトルの相関性を評価することとした。

#### (4) 溶出特性と近赤外スペクトルの相関解析

溶出特性とNIRスペクトルの相関性を評価するため、多変量解析の手法の一つであるPLS回帰分析によって、「(1)溶出試験」の項で算出した溶出速度定数(k)(表2参照)と造粒品、整粒品および乾燥品のNIRスペクトルデータ(全波数領域： $10000\sim 4000\text{cm}^{-1}$ )の相関付けを行った。その結果、造粒品および整粒品については、寄与率が造粒品は約25%、整粒品は約60%と低く、相関性は認められなかった。この原因として、これらサンプルについては未乾燥品であったため、多量の水を含んでおり、その水の吸収そのものがスペクトルに大きく反映されてしまい、 $7000\text{cm}^{-1}$ と $5200\text{cm}^{-1}$ 付近の特異的な吸光強度の変化を相殺してしまったためではないかと考えられた。

それに対し、乾燥品については寄与率が約80%で、溶出速度定数(k)とNIRスペクトルの間に良好な相関性が

認められた。

以上のように、溶出速度定数(k)とNIRスペクトルの間に良好な相関性が認められたことから、われわれ研究班では、NIRスペクトルにおける水の吸収帯の変化の追跡による造粒品の溶出特性予測の可能性が示唆されたのではないかと考察した。

## まとめ

研究開発段階研究班では、製品品質を造り込むという観点から、頑健な製剤設計・製造設計に対し、PATが具体的にどのように機能するかを明らかにするという目標を掲げ、研究を行った。具体的には、最終製品の溶出挙動に及ぼす造粒工程の影響度の大きさに注目し、造粒状態をリアルタイムにモニタリングし、最終製品の溶出挙動を予測することを目標とした。そして、造粒状態の異なる造粒品を製し、NIRスペクトルの変化との相関から造粒品の溶出速度の予測を試みた。

その結果、造粒品のNIRスペクトルにおける水の吸収帯の変化と溶出速度の間に相関が認められた。このことから、われわれ研究班ではNIRスペクトルにおける水の吸収帯の変化の追跡による造粒品の溶出速度予測の可能

性が示唆されたのではないかと結論に至った。ただし、今回、われわれが得た知見は、繰り返し1回の実験に基づくものであり、その妥当性については、今後さらに詳細な検討が必要であると思われる。

## おわりに

今回、われわれ研究班では、造粒状態の異なる造粒品を製し、NIRスペクトルの変化との相関から造粒品の溶出速度の予測を試みるということにチャレンジしたが、今後、このような研究を通して、NIRなどを用いた造粒工程のモニタリングにより、最終製品の品質予測が可能になるのであれば、研究開発段階で多くの時間を費やした最終製品の品質評価が省略でき、よりきめ細かな造粒条件等の検討が可能になると期待される。そして、その結果として、FDAがPATガイダンスにおいて掲げている頑健な製剤設計・製造設計、製品品質を造り込むということにつながることを期待したい。



PAT②

## PATのための分析法の可能性

## Potentiality of the Analytical Method for PAT

日本PDA技術教育委員会 PAT検討会 分析法可能性研究班

武田薬品工業株式会社・松永浩和, ブルカー・オプティクス株式会社・三浦 剛(リーダー),  
 国立医薬品食品衛生研究所・坂本知昭, アステラス製薬株式会社・松浦光高,  
 株式会社住化分析センター・畑田幸栄, 株式会社島津製作所・鈴木康志,  
 ブルカーAXS株式会社・駒井 彰, 千代田化工建設株式会社・橋本葎人,  
 国立医薬品食品衛生研究所・檜山行雄

## はじめに

日本PDA技術教育委員会 PAT検討会において分析法可能性研究班では、研究開発段階あるいは製品の製造段階で工程に導入されるPATツールについて、現在いろいろな工程のモニタリング用として利用されている近赤外分光法(NIR法)を取り上げ、真度に優れる高速液体クロマトグラフィー(HPLC法)と比較しながら、どのような観点からPATツールに適用できるモニタリング法としての分析条件や測定法を設定すればよいか検討した。さらにリアルタイムリリースの観点から、工程のモニタリングに用いられる評価法が求められる「試験精度」について取り上げ、要件を満たすための「試験デザイン」についても考察した。

## 1. HPLC法とNIR法

PATに限らず、1つの評価法を設定する際に、何を測定の主目的とするかによって、選択される分析法も異なってくる。一般に製造工程や最終製品の含量や純度試験に用いる分析法は、真度に優れた方法を選択するという考え方が有意であり、この観点で選択し使用してきた分析法をそのままPATの分析ツールとして使用できれば、誰も何の迷いもなく、現在、定量試験に広く利用されているHPLC法を選択することになるであろう。しかしながら、HPLC法は測定の前に測定の律速となる試料溶液の調製が必要であることや、試料調製操作自体が破壊分析であることから、PATガイダンスに明記され

ているリアルタイムモニタリングやリアルタイムリリースに適した分析法とは言い難い。一方、近年、非破壊分析や迅速な分析が可能ということでPAT分析ツールとして脚光を浴びているNIR法は、測定時間も速く、試料の前処理もないことから、確かにPAT分析ツールとして魅力的な要素を有しているが、真度については十分に注意し、評価法を設定する必要があることを忘れてはいけない。図1に目的シグナルの抽出方法がHPLC法とNIR法でどのように異なるのかを模式的に示すが、HPLC法はあらかじめ目的成分を単一成分に分離した後、測定することから真度に優れた方法であるのに対し、NIR法は目的成分をマトリックスごとに測定し、測定波長の選択や統計的あるいは数理解析処理により目的成分に由来する信号を抽出、あるいは測定に不要な夾雑物由来の信号を除去する方法である。真度の証を分離パターンで実際に目で確認できるHPLC法と異なり、信号の処理には慎重な解析が必要であるとともに、目的とする真度達成を確認するための十分な検証が重要である。

## 目的シグナル抽出の違いと迅速分析へのアプローチ

- (1) HPLC法→あらかじめ分離してからの測定  
分離時間の迅速化(超高速HPLC)  
破壊分析である⇔単一成分の分析(真度に優れる)
- (2) 分光分析→検出信号を解析処理技術で分離  
統計的・数理的処理による目的信号の抽出  
による短時間化(ケモメトリックスの応用)  
非破壊分析である⇔多くの夾雑信号の共存  
(短時間測定) (慎重な解析が必要)

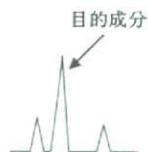


図1 目的シグナル抽出の違いについて