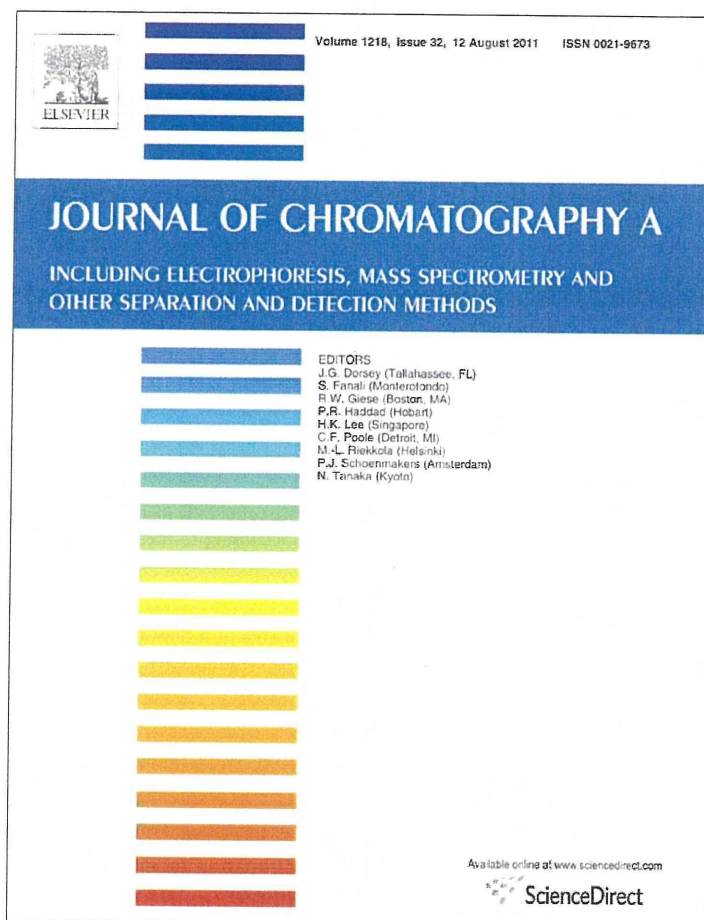


Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.

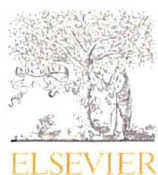


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



## Size separation of colloiddally dispersed nanoparticles using a monolithic capillary column

Kumiko Sakai-Kato<sup>a,\*</sup>, Shigenori Ota<sup>b</sup>, Toyohide Takeuchi<sup>c</sup>, Toru Kawanishi<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Division of Drugs, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>b</sup> R & D Department, GL Sciences Inc. 237-2 Sayamagahara, Iruma, Saitama 358-0032, Japan

<sup>c</sup> Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 November 2010

Received in revised form 14 June 2011

Accepted 14 June 2011

Available online 22 June 2011

#### Keywords:

Nanoparticles

Monolithic column

Size exclusion chromatography

### ABSTRACT

We developed a method to separate colloiddally dispersed nanoparticles on monolithic capillary columns. Silica nanoparticles were eluted according to their sizes, and the plots of the logarithm of the size of nanoparticles against their elution volume showed good linearity ( $r=0.992$ ) over wide range of sizes. Because of the high porosity of the monolithic column (porosity; 88%), the column's length could be increased without clogging of the dispersed samples and the pressure in a long column (500 mm  $\times$  0.2 mm i.d.) was low, with a value of 5.8 MPa at a flow rate of 1  $\mu$ L/min. We demonstrate that this method using monolithic capillary columns could be used as a powerful tool for size separation of nanometer-size materials, which will open a new pathway to quality control of nanomaterials in nanotechnology applications.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Recent advances in nanotechnology have enabled the development of modern drug carrier systems that play an important role in the controlled delivery of pharmacological agents to their targets at a therapeutically optimal rate and dose [1]. "Soft" nanocarriers including micelles, polymers, and lipid nanoparticles have been used for drug delivery [2,3]. Carriers with greater hardness or density, including colloiddally dispersed nanoparticles composed of silica, gold, or iron oxide, also have been used for drug and gene therapeutics and for diagnostic imaging [4,5]. These colloiddally dispersed nanoparticles are also important in other fields: for example, gold nanoparticles have been used as imaging tools [6]; titanium dioxide particles have been used as self-cleaning, anti-bacterial agents and UV protecting agents [7,8]; and cadmium selenide has been used to create semiconductor nanocrystals (quantum dots) [9].

Exact knowledge of the size and size distribution of these nanoparticles is essential for their application in nanoparticulate drug delivery systems, because the nanoparticles' size can substantially affect their physicochemical and biopharmaceutical behavior. For example, variations in particle size can change drug release kinetics or transport phenomena across biological barriers, as well as pharmacokinetics in the human body [10–12].

Fractionation techniques offer advantages over non-fractionation techniques for particle sizing because fractionation techniques produce information about average particle size and the distribution of particle sizes for a given sample. Non-fractionation techniques, such as photon correlation spectroscopy, suffer from lower resolution than that afforded by fractionation techniques and thus are not as well suited for the analysis of samples with broad particle size distributions.

Among methods for the size analysis and characterization of macromolecules, flow-assisted techniques such as size exclusion chromatography (SEC) [13,14], hydrodynamic chromatography (HDC) [15,16], field-flow fractionation (FFF) [17–19] and capillary hydrodynamic fractionation [20] are suitable for separation of samples on the basis of differences in the physical size indexes of the analytes.

When colloids possess an electric charge in buffered aqueous solutions, electrophoretic separation methods are also among those utilized methods for particle separation and characterization. Reports have been made to employ capillary electrophoresis for analytical separations of charged particulate materials, mostly carried out by capillary zone electrophoresis [21–23].

SEC is the most commonly used fractionation method for particle sizing. Usually, SEC is performed on a column packed with polymer gel or porous silica microparticles with pore-size distributions over the range of a few to a few hundred nanometers. Polymer samples are separated with such packed SEC columns [13]. In addition, nanoparticulate drug carriers such as liposomes are often separated from small solutes by means of SEC [24].

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 9662; fax: +81 3 3700 9662.  
E-mail address: [kumikato@nihs.go.jp](mailto:kumikato@nihs.go.jp) (K. Sakai-Kato).

Recently, Ute et al. reported SEC of a polystyrene polymer on monolithic silica columns using tetrahydrofuran (THF) as the eluent [25]. Monolithic silica columns have received much attention as a newly introduced technology for HPLC and capillary electrochromatography [26]. These columns consist of a single piece of porous material (most often polymer- or silica-based) with a bimodal pore structure consisting of “throughpores” (pore size  $\sim 1.5\text{--}5\ \mu\text{m}$ ) and “mesopores in the skeleton” ( $\sim 10\text{--}25\ \text{nm}$ ) [27]. Typically, monolithic columns provide higher porosity compared to conventional columns packed with spherical particles, and such higher porosity results in much lower column backpressure. Furthermore, the throughpore/skeleton size ratio of 2–4 in a monolithic column is much greater than the ratio of 0.25–0.4 typically found in a column packed with particles [28]. This increased size ratio enables the use of a long column, thus leading to high separation efficiency [29]. The sizes of the skeletons and throughpores can be independently controlled by changing the preparation conditions, including the nature of the porogen.

In this paper, we report the size separation of colloidal dispersed nanoparticles by means of a monolithic capillary column. We used monolithic columns consisting of silica derivatized with an amide group, i.e., a neutral hydrophilic bond that prohibits the adsorption of samples on the silica monolith by ion-exchange interaction and that would enable the analysis of charged soft nanocarriers such as liposomes derived from biomaterials. We analyzed the colloidal silica nanoparticles by their sizes using a monolithic capillary column. We expected that the high porosity of the monolithic columns would prevent colloidal samples from clogging the columns.

## 2. Materials and methods

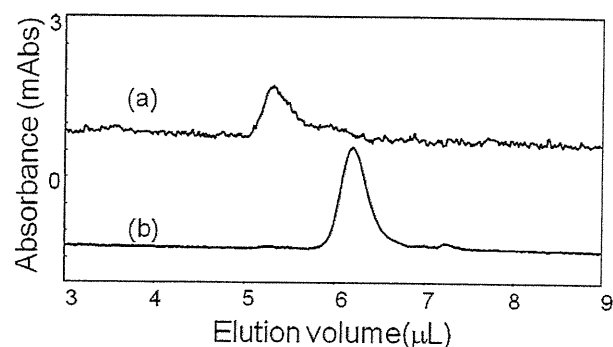
### 2.1. Chemicals

Silica nanoparticles (Cataloid S) with sizes of 5, 11, 26, 45, and 78 nm were obtained from JGC Catalysts and Chemicals Ltd. (Kanagawa, Japan). Methanol (HPLC grade) and dextran standards were obtained from Sigma–Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA). Sodium nitrate was from Kanto Chemicals (Tokyo, Japan). Samples were dissolved or dispersed in eluent and filtered through a  $0.20\text{-}\mu\text{m}$  filter (Millex-LG, Millipore Corp., Tokyo, Japan) prior to being applied to the columns. Polydispersity index (PDI) of silica nanoparticles and hydrodynamic diameters of dextran standards in eluent were measured using dynamic light scattering measurement (ZetasizerNano, Malvern, UK).

### 2.2. LC conditions

Sample separation was performed with a capillary LC system equipped with a capillary HPLC pump (MP711V; GL Sciences, Tokyo, Japan), a four-port internal sample injector (fixed volume: 10 nL; Valco Instrument Co. Inc., Houston, TX, USA), and a capillary ultraviolet–visible (UV–Vis) detector (MU701; GL Sciences).

Samples were analyzed on a MonoCap Amide column ( $500\ \text{mm} \times 0.2\ \text{mm}$ ;  $1\ \mu\text{m}$  skeleton,  $2\ \mu\text{m}$  throughpore, and 15 nm mesopore; GL Sciences). The permeability is represented by a  $K$  value ( $K = u\epsilon_0\eta L/\Delta P$ , where  $u$  stands for the linear velocity of the eluent,  $\epsilon_0$  for total porosity of the column,  $\eta$  for solvent viscosity,  $L$  for column length, and  $\Delta P$  for pressure drop [30]). Permeability was measured in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) containing methanol (20% v/v). The total porosity of the column,  $\epsilon_0$  was estimated using void times of hollow capillary column and monolithic capillary column, and total volume of the column. The mobile phase consisted of a 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) containing methanol (20% v/v). The mobile phase was delivered at a rate of



**Fig. 1.** Effect of eluent composition on elution profile of a sample of 26 nm silica nanoparticles. Column: Capillary EX nano Monocap Amide ( $250\ \text{mm} \times 0.2\ \text{mm}$  i.d.); eluent: (a) water or (b) 10 mM phosphate buffer (pH 7.2); flow rate:  $1\ \mu\text{L}/\text{min}$ .

$0.1\text{--}1\ \mu\text{L}/\text{min}$  and the column was kept at room temperature. The detector was operated at a wavelength of 210 nm. A sample volume of 10 nL was injected for each analysis. The morphology of the monolithic silica was examined by a scanning electron microscope (SEM; S-3000N, Hitachi). For the measurement of flow rate, we used a flowmeter composed of  $5\text{-}\mu\text{L}$  microsyringe attached to the end of the column.

## 3. Results and discussion

Usually, SEC is performed with a column packed with polymer gel or porous silica microparticles. However, such columns could become clogged when used to separate colloidal dispersed nanoparticles with sufficient hardness or high density, such as inorganic nanoparticles. Therefore, in this study monolithic capillary columns with high porosity were used for the analysis of colloidal dispersed nanoparticles.

### 3.1. Detection

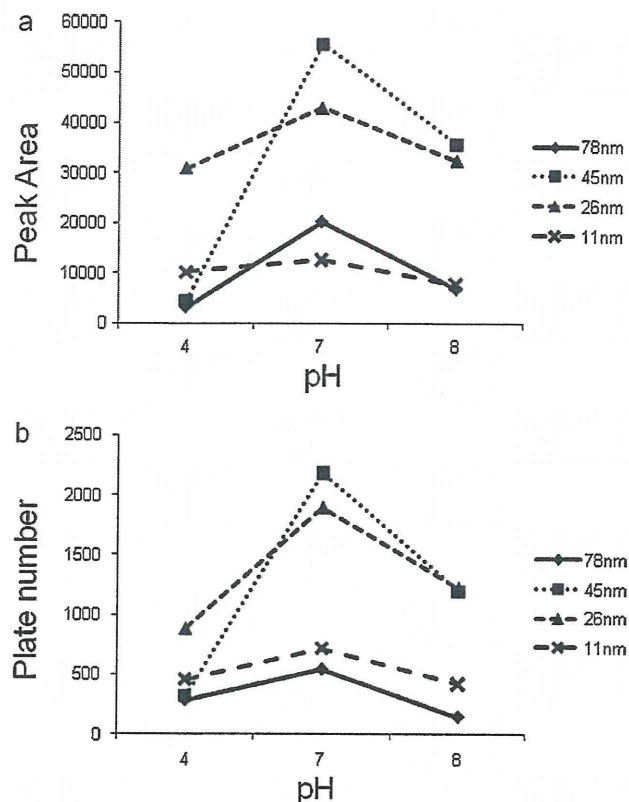
In this study, we used different sizes of silica nanoparticles. The detection method used was based on turbidimetric detection, in which colloidal species are observed with a UV–Vis detector [31,32]. Although silica nanoparticles do not contain any chromophores, it is expected that a portion of incident UV light is scattered by the silica nanoparticles, thereby reducing the intensity of light reaching the photomultiplier. This reduction in light intensity provides an apparent absorption value. In this experiment, we used different concentrations of silica nanoparticles depending on their sizes, because the larger the silica colloid, the larger the pseudo-UV absorbance observed. To achieve an optimal signal-to-noise ratio, the detector wavelength was set to 210 nm for the experiments described here.

### 3.2. Optimization of eluent

It is important that the silica nanoparticles maintain a consistent size during analysis; therefore, an eluent should be chosen that does not cause gelation, aggregation, or dissolution of the particles. As shown by the unstable baseline and small sample peak in Fig. 1(a), water was not appropriate as an eluent compared with phosphate buffer (Fig. 1(b)). It is considered that the silica nanoparticles probably are not stable and coagulated in plain water, and silica nanoparticles are prone to clogging injectors or columns which lead to small peak area in plain water [33]. For these reasons we used phosphate buffer as the eluent in our studies.

We also examined the effect of the eluent pH on the peak area and plate number of silica nanoparticles. We used 10 mM phos-



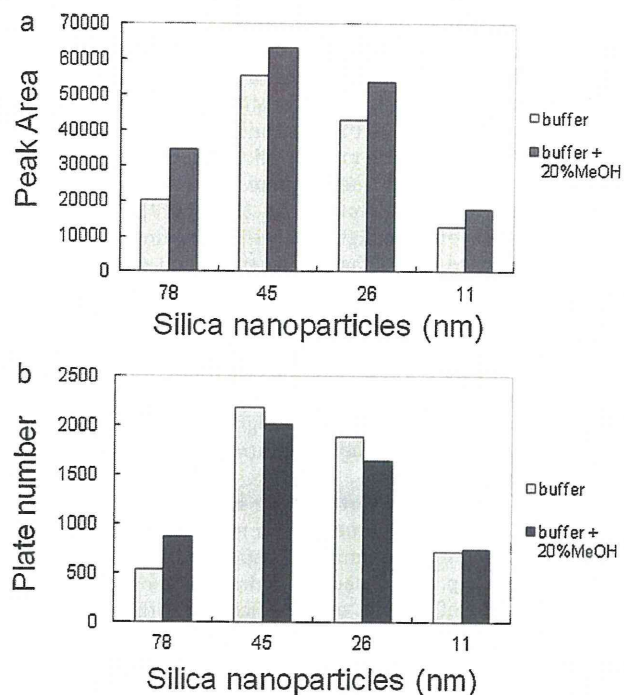


**Fig. 2.** Effect of eluent pH on (a) peak area and (b) plate number of various sizes of silica nanoparticles. Eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 4, 7.2, or 8); sample: 0.3% (w/v) 78 nm, 0.5% (w/v) 45 nm, 1% (w/v) 26 nm, and 1% (w/v) 11 nm silica nanoparticles. Each sample containing one size of particles. Other conditions are the same as those described in Fig. 1.

phosphate buffer at pH 4, 7.2, and 8. As shown in Fig. 2, both the peak area and the plate number were the largest at pH 7.2 for all sizes of silica nanoparticles. It is probable that coagulation of silica nanoparticles takes place at lower pH, due to a decrease in electrostatic repulsion, and silica nanoparticles are prone to clogging injectors or columns which lead to small peak area in plain water. Considering the above results and the stability of the separation column, we used phosphate buffer at pH 7.2 in our studies.

Examining the effect of phosphate buffer concentration on sample peak size, we found that the sample peak area was larger in 10 mM phosphate buffer than it was in 50 mM phosphate buffer. This difference was most pronounced for the sample of 78-nm silica nanoparticles (data not shown). The decrease in peak area with increasing buffer concentration was probably caused by nanoparticle coagulation that would have been induced by high concentrations of sodium cations in the buffer [34]. Therefore, we used 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) in our experiments.

Finally, we examined the effect of organic solvent on sample peak area. Because slightly larger peak areas were observed with methanol than with acetonitrile, we selected methanol as an organic solvent (data not shown). This preference for methanol may be ascribed to a different hydrogen bonding force between silica nanoparticles and methanol or acetonitrile. By adding methanol at 20% (v/v) to the eluent, peak areas of all sample peaks were increased; however, the plate number did not increase for all sizes of nanoparticles (Fig. 3). Further increases in the organic solvent ratio up to 90% (v/v) largely decreased the peak area. This observed decrease in peak area with increasing organic solvent ratio probably occurred because the presence of the solvent decreased the electric double layer around the nanoparticles, which would have resulted



**Fig. 3.** Effect of methanol ratio in the eluent on (a) peak area and (b) plate number of various sizes of silica nanoparticles. Eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) or 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 20% methanol. The other chromatographic conditions were the same as in Fig. 2.

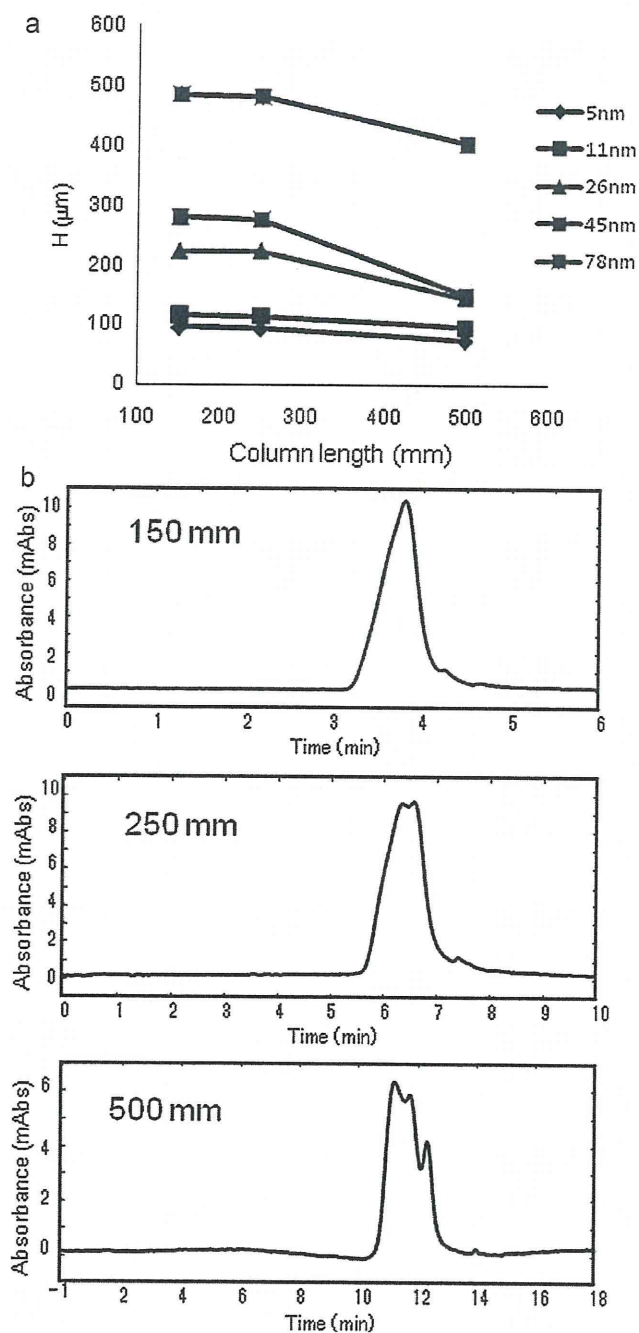
in the reduction of repulsion between each nanoparticle and thus increased particle aggregation. Therefore, 20% methanol was added to the phosphate buffer in our experiments. When 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 20% methanol was used as the eluent, the pressure in a long column (500 mm × 0.2 mm i.d.) was low, with a value of 5.8 MPa at a flow rate of 1  $\mu$ L/min. Under this condition, the permeability  $K$  was  $6.7 \times 10^{-14}$  m<sup>2</sup> and the total porosity of the column was 88%.

### 3.3. Effect of column length and flow rate on silica nanoparticle separation

The use of longer monolithic columns would be one possible way to better separate mix samples. Fig. 4(a) shows the effect of column length on column efficiency for silica nanoparticles with different sizes. We used 150, 250, and 500 mm columns; these are all that are commercially available. The column efficiency slightly increased with column length for all silicate nanoparticles using the same eluent and flow rate (1  $\mu$ L/min). This result is probably explained by the external-band broadening contributions [35]. The contribution of external-band broadening contributions to total system efficiency was larger as the column length decreased and the ratio of extra-column variance to total system variance were 37, 54, 78%, when nanoparticles of size of 78 nm were analyzed onto 500, 250, and 150 mm columns, respectively. The extra-column variance was calculated by measuring the half bandwidth of nanoparticle peak analyzed without column. Although using a longer column takes a longer time to elute solutes, it has an advantage for better separation of a mixture sample. In fact, as shown in Fig. 4(b), the separation of silica nanoparticles mixture was gradually improved by using longer column length, although the elution time is getting longer.

Further, we examined the effect of flow rate on column efficiency to improve the separation of the silica nanoparticle mixture. We confirmed the accuracy and precision of flow rate with various





**Fig. 4.** Effect of column length on (a) plate number and (b) silica nanoparticle separation. Column: Capillary EX nano Monocap Amide (150, 250, and 500 mm  $\times$  0.2 mm i.d.); eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 20% methanol; sample: (a) 0.3% (w/v) 78 nm, 0.5% (w/v) 45 nm, 1% (w/v) 26 nm, 1% (w/v) 11 nm, 2% (w/v) 5 nm silica nanoparticles, (b) mixture of 1% (w/v) 78 nm, 2.8% (w/v) 26 nm, 10% (w/v) 5 nm. Flow rate: 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

flow rate settings using a flow meter at the outlet of the column, and proved the accuracy and precision of flow rate including low flow rate we used in our report (Table 1). We also confirmed that the silica nanoparticles have a narrow distribution suitable for assessment of column efficiency. We measured the polydispersity index (PDI) of each silica nanoparticle by dynamic light scattering. The PDI value is an estimate of the distribution width and for a narrow distribution, a PDI of around 0.1 or lower is expected. The PDI values were 0.018 (78 nm silica), 0.022 (45 nm), 0.053 (26 nm),

**Table 1**  
Accuracy and precision of flow rate.

	Flow ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )					
	3	2	1	0.5	0.2	0.1
Mean	2.972	1.991	0.999	0.497	0.200	0.0996
SD	0.0157	0.0083	0.0037	0.0023	0.0004	0.0003
Precision (%)	0.53	0.42	0.37	0.47	0.18	0.28
Accuracy (%)	99.08	99.56	99.93	99.30	99.81	99.59

Flow rate was measured using a flow meter according to the manufacturer's protocol. Column: Capillary EX nano Monocap Amide (500 mm  $\times$  0.2 mm i.d.); eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 20% methanol.

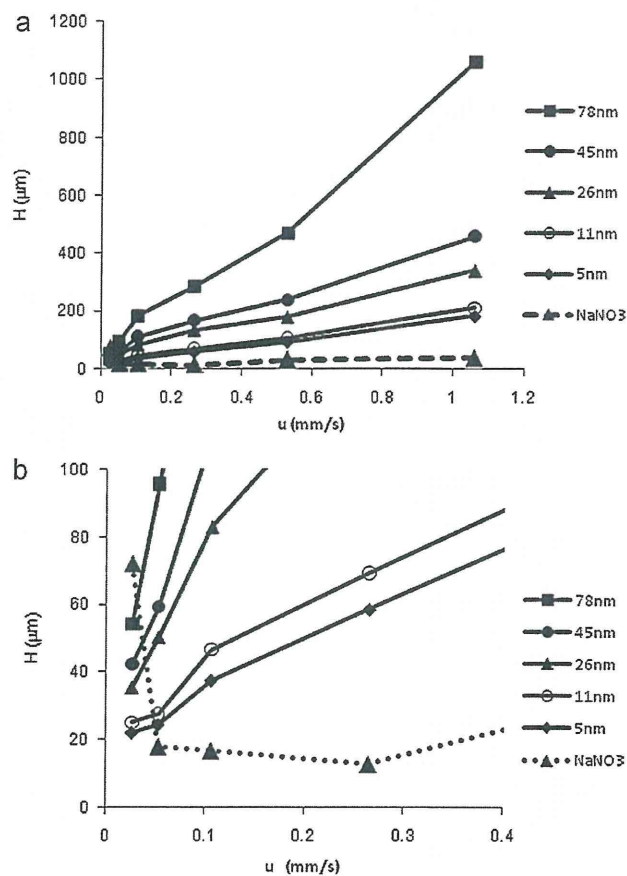
0.085 (11 nm), 0.169 (5 nm). Although, PDI value of 5-nm silica nanoparticle was a little larger than 0.1, the distribution of other nanoparticles was narrow according to PDI values.

In SEC, for discussion of the effect of flow rate on plate height ( $H$ ), Giddings' coupling theory can be simply represented by [36]

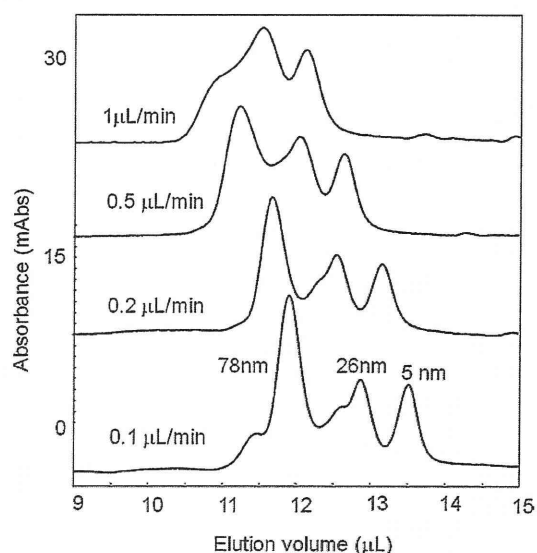
$$H = \frac{1}{(1/A) + (1/Eu)} + \frac{B}{u} + Cu. \quad (1)$$

In this equation,  $u$  is the eluent linear velocity, and  $A$ ,  $B$ ,  $C$ , and  $E$  are coefficients that contribute to band broadening and thus to  $H$ . The contribution of each of the terms in Eq. (1) to  $H$  are functions of (1) the coupling effect of eddy diffusion,  $A$  term (a simple flow-splitting phenomenon that is not expected to vary with linear velocity) and lateral diffusion,  $E$  term (extraparticle mass transfer in case of packed column), (2) longitudinal diffusion,  $B$  term, and (3) mass transfer,  $C$  term (solute diffuse in and out the pores and stationary-phase mass transfer effect involving basic sorption-desorption process). The curves of  $H$  versus  $u$  are shown in Fig. 5(a) and part of this graph was enlarged in Fig. 5(b). For sodium nitrate, the plate height is mainly determined by longitudinal molecular diffusion, which is a result of the relatively high values of  $B$  term (proportional to molecular diffusion coefficient). This causes  $H$  to increase drastically with low-velocity regions as shown in Fig. 5(b). On the other hand, the longitudinal effect (2) is generally insignificant for macromolecules, band broadening is controlled by mass transfer terms (3) or by coupling effects of eddy diffusion and lateral diffusion (1). For the mass transfer processes ( $C$  term), the magnitude of the  $C$  term is dependent on the rate of diffusion of solute in and out of the pore structure. Therefore, larger, slower-diffusing molecules increase the value of the  $C$  term more than do smaller, faster-diffusing molecules [37]. In fact, as shown in Fig. 5(a), the  $H$  versus  $u$  curves of silica nanoparticles were almost linear ( $r = 0.993$ – $0.998$ ) over the whole range we examined, which is different from sodium nitrate, as reported using porous silica particle columns [38]. Furthermore, the slopes of linear curves increased with an increase in the particle sizes. These results indicate that  $C$  term is a dominant plate-height term for silica nanoparticles analysis on a monolithic column.

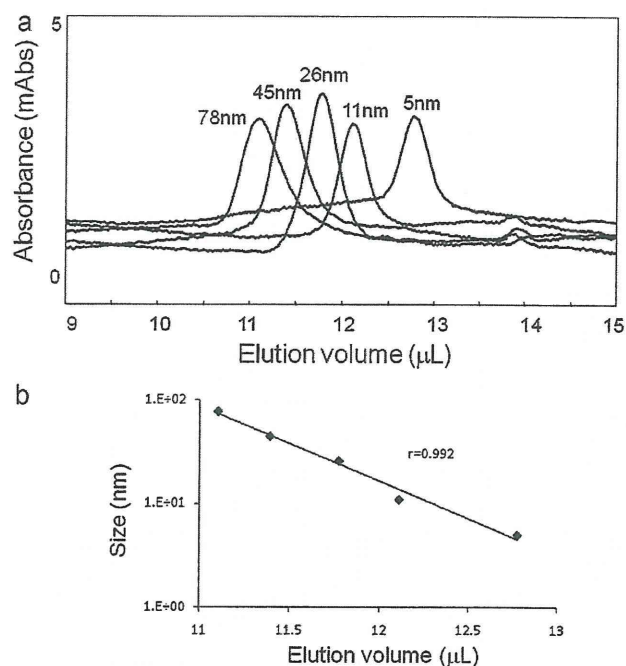
From Fig. 5, we expected that a decrease in  $u$  should decrease  $H$  and thus increase peak resolution. In the present study, the peak resolution improved with decreasing flow rate when a mixture of different sizes of silica nanoparticles (78, 26, and 5 nm) were analyzed on a 500 mm  $\times$  0.2 mm i.d. capillary monolithic column (Fig. 6). As shown in Fig. 6, an increase in peak resolution was observed with a decrease in flow rate. The shift of peaks by the decrease in flow rate was presumably caused by an increase in permeation for nanoparticles into porous structure of silica monolith. At a flow rate of 0.1  $\mu\text{L}/\text{min}$ , some aggregates were detected that were not observed at faster flow rates. A similar increase in resolution also has been reported for a mixture of proteins separated at various flow rates on a silicagel-packed column [39].



**Fig. 5.** (a) Plots of plate height ( $H$ ) values against linear velocity of eluent ( $u$ ) and (b) its low velocity region. Column: Capillary EX nano Monocap Amide (500 mm  $\times$  0.2 mm i.d.); eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 20% methanol; sample: 0.3% (w/v) 78 nm, 0.5% (w/v) 45 nm, 1% (w/v) 26 nm, 1% (w/v) 11 nm, 2% (w/v) 5 nm silica nanoparticles, and 10  $\mu$ g/mL sodium nitrate.



**Fig. 6.** Effect of flow rate on peak resolution of silica nanoparticles. Column: Capillary EX nano Monocap Amide (500 mm  $\times$  0.2 mm i.d.); eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 20% methanol; sample: mixture of 1% (w/v) 78 nm, 2.8% (w/v) 26 nm, and 10% (w/v) 5 nm silica nanoparticles; flow rate: 1, 0.5, 0.2, or 0.1  $\mu$ L/min. The other conditions were the same as described in Fig. 1.



**Fig. 7.** (a) Particle size distribution overlay plot for five sizes of silica nanoparticles and (b) plot of the logarithm of the mass of 1 mol particles as a function of elution volume for each size of silica nanoparticles. Column: Capillary EX nano Monocap Amide (500 mm  $\times$  0.2 mm i.d.); flow rate: 0.5  $\mu$ L/min; samples: solutions of 0.3% (w/v) 78 nm, 0.5% (w/v) 45 nm, 1% (w/v) 26 nm, 2% (w/v) 11 nm, and 1.5% (w/v) 5 nm silica nanoparticles. The other conditions were the same as described in Fig. 4.

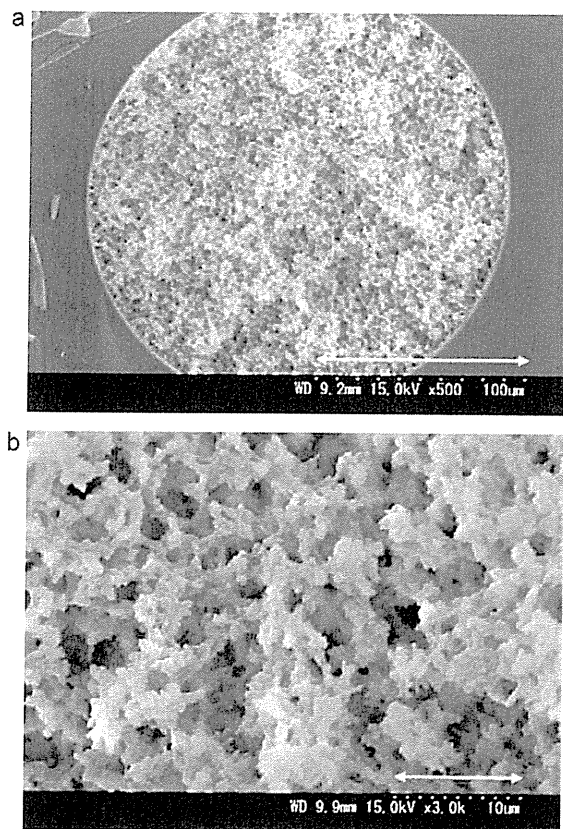
### 3.4. Calibration curve

Fig. 7(a) shows an overlay of the particle size distribution obtained for five different samples. The nanoparticles were eluted in order of decreasing size. The logarithm of size of nanoparticles was plotted against its elution volume (Fig. 7(b)).

The plot was almost linear ( $r = -0.992$ ) over a wide range of sizes including a very large size region beyond the size of mesopores (15 nm). Because SEM micrographs show the presence of very rough surfaces of the monolithic silica support in micron and sub-micron ranges (Fig. 8), our result indicates that not only mesopores but also these rough structures contribute to the size separation of silica nanoparticles.

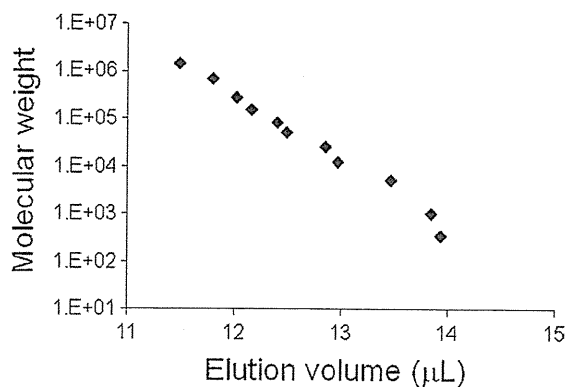
We further explored the separation mechanism by drawing the molecular weight *versus* elution volume plot using dextran standards because silica nanoparticles with low molecular weight cannot be obtained. As shown in Fig. 9, the plot was linear at the high molecular weight region. Because the average hydrodynamic size of the largest dextran standard is 48 nm, this result indicates that the wide pore size distribution of the monolithic structure contributes to the selective permeation for a wide range of dextran standards and that size separation is possible beyond the range provided by the mesopores. Fig. 9 also shows that the plot curves at the low molecular weight region of below about 1000, which indicates that the permeation limit of this column exists as SEC mode.

Others also have reported that the separation of polystyrene standards according to molecular weight apparently occurred not only in the mesopores of a silica monolith (internal pore zone) but also at the outside (external pore zone) [25,40]. Ute et al. reported that when polystyrene standards were separated on a monolithic capillary column, the resulting calibration curve was linear over a wide range of masses as shown here [25]. We also examined the repeatability of the elution times using 26 and 76 nm silica nanoparticles, and relative standard deviations of the elution



**Fig. 8.** Scanning electron micrographs of monolithic silica capillary columns. Scale bars corresponding to 100  $\mu\text{m}$  for (a) and 10  $\mu\text{m}$  for (b).

times were 0.24 and 0.15% ( $n=3$ ), respectively. The good linearity and repeatability of elution observed in our study indicates that this monolithic column can be used with minimal unfavorable adsorption of the solute on the column skeleton and can be used for knowledge of size and size distribution of nanoparticle samples using the calibration curve. This minimal adsorption is ascribed to alteration of the silica surface by organic functional groups. By modifying the size of mesopores or throughpores in monolithic columns, it would be possible to further clarify the separation mechanism and design columns to resolve nanoparticles



**Fig. 9.** Selective permeation of dextran standards. Column: Capillary EX nano Monocap Amide (500 mm  $\times$  0.2 mm i.d.); eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 20% methanol; flow rate: 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; sample: dextran standard; detection: UV190 nm.

with wide size ranges. Also, quantitative evaluation of particle size distribution using chromatograms remains to be solved.

#### 4. Conclusions

In this study, we used a monolithic capillary column to develop a novel technique for the highly resolved separation of colloiddally dispersed nanoparticles by their sizes. Because the column had a low backpressure, an increase in resolution could easily be achieved by elongating the column length. By optimizing the flow rate in the column, we resolved nanoparticles with only slight differences in size. The molecular weight *versus* elution volume plot curves at the low molecular weight region of below about 1000, which indicates that the permeation limit of this column exists as SEC mode. In future studies, the effect of these monolithic column structures (the sizes of mesopores and throughpores) on nanoparticle separation should be further explored to clarify the details of separation mechanism. This separation method represents a powerful means of size distribution for quality control of manufactured nanotechnology medicinal products, and this method can also be used to detect these products' impurities, including their aggregates. Therefore, this method could be used to analyze other industry-important dispersed nanomaterials, including carbon nanotubes or fullerenes.

#### Acknowledgements

The authors are grateful for financial support from the Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices Project (The Japan Health Sciences Foundation), a Health Labor Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW), and KAKENHI (21790046) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT), Japan. The authors thank Eisai Co., Ltd. for fruitful discussion.

#### References

- [1] M. Ferrari, Nat. Rev. Cancer 5 (2005) 161.
- [2] R. Duncan, Nat. Rev. Cancer 6 (2006) 687.
- [3] V.P. Torchilin, Nat. Rev. Drug Discov. 4 (2005) 145.
- [4] C. Barbé, J. Bartlett, L. Kong, K. Finnie, H.Q. Lin, M. Larkin, S. Calleja, A. Bush, G. Calleja, Adv. Mater. 16 (2004) 1959.
- [5] I.I. Slowing, B.G. Trewyn, S. Giri, V.S.-Y. Lin, Adv. Funct. Mater. 17 (2007) 1225.
- [6] Z.Y. Zhong, K.B. Male, J.H.T. Luong, Anal. Lett. 36 (2003) 3097.
- [7] K. Han, M. Yu, J. Appl. Polym. Sci. 100 (2006) 1588.
- [8] R. Dastjerdi, M. Montazer, Colloids Surf. B: Biointerfaces 79 (2010) 5.
- [9] C.B. Murray, D.J. Norris, M.G. Bawendi, J. Am. Chem. Soc. 115 (2002) 625.
- [10] J.F. Hillyer, R.M. Albrecht, J. Pharm. Sci. 90 (2001) 1927.
- [11] A. Lamprecht, Y. Bouligand, J.P. Benoit, J. Control. Release 84 (2002) 59.
- [12] J. Rejman, V. Oberle, I.S. Zuhorn, D. Hoekstra, Biochem. J. 377 (2004) 159.
- [13] J.J. Kirkland, J. Chromatogr. 125 (1976) 231.
- [14] S.S. Huang, C.-S. Wu (Eds.), Handbook of Size Exclusion Chromatography and Related Techniques, Marcel Dekker, New York, 2004, p. 677.
- [15] H. Small, J. Colloid Interface Sci. 48 (1974) 147.
- [16] A. Williams, E. Varela, E. Meehan, K. Tribe, Int. J. Pharm. 242 (2002) 295.
- [17] J.C. Giddings, Science 260 (1993) 1456.
- [18] J.C. Giddings, Anal. Chem. 67 (1995) 592A.
- [19] M.H. Moon, I. Park, Y. Kim, J. Chromatogr. A 813 (1998) 91.
- [20] C.A. Silebi, J.G. Dosramos, J. Colloid. Interface Sci. 130 (1989) 14.
- [21] B.B. VanOrman, G.L. McIntire, J. Microcolumn Sep. 1 (1989) 289.
- [22] H. Ahmadzadeh, R. Dua, A.D. Presley, E.A. Arriaga, J. Chromatogr. A 1064 (2005) 107.
- [23] Y.H. Rezenom, A.D. Wellman, L. Tilstra, C.D. Medley, S.D. Gilman, Analyst 132 (2007) 1215.
- [24] C. Grabielle-Madellmont, S. Lesieur, M. Ollivon, J. Biochem. Biophys. Methods 56 (2003) 189.
- [25] K. Ute, S. Yoshida, T. Kitayama, T. bamba, K. Harada, E. Fukusaki, A. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, Polym. J. 38 (2006) 1194.
- [26] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, Anal. Chem. 68 (1996) 3498.
- [27] N. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, Anal. Chem. 73 (2001) 420A.
- [28] K.K. Unger, Porous Silica; Journal of Chromatography Library, vol. 16, Elsevier, Amsterdam, 1979.



- [29] K. Miyamoto, T. Hara, H. Kobayashi, H. Morisaka, D. Tokuda, K. Horie, K. Koduki, S. Makino, O. Núñez, C. Yang, T. Kawabe, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ishihama, N. Tanaka, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8741.
- [30] G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1168 (2007) 101.
- [31] A. Zattoni, E.L. Piccolomini, G. Torsi, P. Reschiglian, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6469.
- [32] Z. Aspanut, T. Yamada, L.W. Lim, T. Takeuchi, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 353.
- [33] T. Takeuchi, Siswoyo, Z. Aspanut, L.W. Lim, *Anal. Sci.* 25 (2009) 301.
- [34] J. Depasse, A. Watillon, *J. Colloid Interface Sci.* 33 (1970) 430.
- [35] F. Gritti, C.A. Sanchez, T. Farkas, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3000.
- [36] J.C. Giddings, *Dynamics of Chromatography: Principles and Theory*, Marcel Dekker, New York, 1965, p. 62.
- [37] A. Striegel, W.W. Yau, J.J. Kirkland, D.D. Bly, *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography*, John Wiley and Sons, Inc., New Jersey, 2009, p. 55.
- [38] G. Stegeman, J.C. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr.* 550 (1991) 721.
- [39] H. Engelhardt, U.M. Schon, *Chromatographia* 22 (1986) 388.
- [40] M. Al-Bokari, D. Cherrak, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 275.

## はじめに

第十六改正 日本薬局方(日局16)は平成23年3月24日に告示されたが、日局16の最も大きい改正点として「製剤総則の改正」があげられる。この改正は50年ぶりの全面改正であり、

- ①口腔内崩壊錠等の医療現場で汎用されている医薬品製剤の収載
- ②これら医薬品製剤を投与経路および適用部位から分類
- ③製剤の機能の確保に必要な試験内容の充実
- ④製剤試験(および貯法)記載の整備
- ⑤国際調和への配慮

を基本方針として行い、国際的にも先導的な内容となっている。本稿では、本誌のテーマである「口腔内崩壊錠」が含まれる、経口的に投与される製剤について、日局16製剤総則における製剤分類、新たに収載した剤形、および各剤形において品質確保に必要な製剤試験に関する記載内容についてまとめるとともに、日本薬局方収載製剤における、口腔内崩壊錠の位置づけを解説する。

なお製剤総則改正内容全般については、他の解説<sup>1,2)</sup>を参照されたい。

## 1 なぜ日本薬局方?

臨床現場で有用な医薬品を開発するためには、有効成分の開発とともに、ヒトに投与するための製剤の開発が両輪となる。また既存の有効成分であっても、新しい製剤が開発されることによって臨床での有用性が大きく増すことがある。本誌のテーマである「口腔内崩壊錠」もその典型的な剤形例である。1980年代後半に欧米で Zydys 技術(カードイナルヘルス)が紹介された後、本邦でも1997年にガスターOD錠(アステラス)の上市を皮切りに、次々と口腔内崩壊錠が製品化されており、現在、服用しやすい錠剤として嚥下困難な高齢者への処方割合

は高い。このような服用性、利便性等を高めた新しい製剤の開発は活発化しており、臨床現場で用いられる製剤は多様化をしている。

一方、医薬品はヒトに投与され、健康に直接関わる製品であることから、市販にあたっては当局に承認申請を行い、承認審査、認可を受ける公共性の高い工業製品という特徴を有する。したがって、医療現場で汎用される製剤については、公的な基準を明らかにすることが望ましい。わが国においては、このような公的な基準は通常、日本薬局方等の基準書、および厚生労働省の担当部局(現在は医薬食品局審査管理課)からの通知として示されている。

日本薬局方は薬事法によって「医療上重要と認められている医薬品の性状および品質などを定めた国定の医薬品規格基準集」と位置づけられる、法律に準じる基準書である。薬事法によって少なくとも10年に一度は全面改正することが求められており、第九改正(昭和51年)以降は5年ごとに全面改正が行われている。日本薬局方の製剤総則は医療現場で汎用される製剤を分類、定義し、それぞれについて製法、品質を保証するために必要な品質試験、品質を保持するための容器・包装、貯法等を示したものであり、局方収載医薬品製剤にとどまらず、わが国で販売される医薬品製剤の基本的な品質要件となるものである。

## 2 日局16製剤総則の改正理由

日本薬局方において、医薬品各条への記載でなく、製剤およびその関連品質管理事項を、独立した製剤総則としてまとめたのは日局6にさかのぼる。さらに日局7(1961年施行)において、主要な剤形をアイウエオ順に記載、それぞれ定義、製法を記した局方製剤総則のスタイルが完成し、以降、日局15までこのスタイルが引き継がれてきた。追加や部分的な改正はされているが、50年近くにわたって基本的な構成は変わっていない。そのため、①口腔内崩壊錠等、現在、臨床現場で汎用されている数

多くの製剤が収載されていない

②分類、定義が適切でない製剤がある(エアゾール剤、液剤、散剤、顆粒剤等)

③各製剤の品質管理に必要な試験等の記載が不十分等の問題が生じていた。そこで7年の検討期間をかけて日局16の告示に合わせて、全面改正した。

### 3 経口的に投与する製剤の分類の考え方

日局16製剤総則では製剤をまず「投与経路および適用部位の別に11の製剤群に大分類し(生薬関連製剤は独立した群として分類した)、さらに剤形の形状、機能、特性から細分類する方法を採用した。分類にあたって、経口的に投与される製剤については、有効成分が消化管内で作用あるいは消化管から吸収されて作用する「経口投与する製剤」と、有効成分が口腔あるいは咽頭に作用あるいは口腔粘膜から吸収される「口腔内に適用する製剤」の区別の必要性の有無について議論が行われた。「経口投与する製剤」は、消化管内における薬物の溶出(吸収)または消化管内での作用を意図した製剤であり、品質管理上で消化管内pHでの溶出性が作用を左右する重要な品質特性である。一方「口腔内に適用する製剤」は、口腔内における薬物の溶出(吸収)または口腔内での作用を意図した製剤であり、口腔内pHでの溶出性が作用を左右する重要な品質特性となる。このように、両製剤では送達経路が異なるため、品質管理のために設定すべき放出試験条件は異なるものとなる。このような議論を経て、「口腔内に適用する製剤」を「経口投与する製剤」とは独立した製剤群として分類することとした(図1)。

### 4 日局16製剤総則：「経口投与する製剤」とは

「経口投与する製剤」に該当する剤形としては日局15製剤総則には、液剤、エリキシル剤、カプセル剤、顆粒剤、懸濁剤・乳剤、散剤、錠剤、シロップ剤、リモナーデ剤が収載されていた。しかし、その分類、定義には以下のような問題があった。

①液剤：品質確保上の留意点の異なる内用剤と外用剤が含まれており、また他の液状の剤形と区別するために、「液状の内用剤又は外用剤で、製剤総則中の他の製剤各条に該当しないものをいう」と不自然な定義、分類がされていた

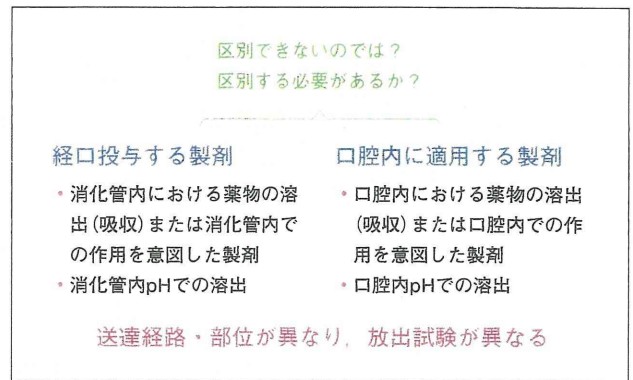


図1 日局16製剤総則における「経口投与する製剤」と「口腔内に適用する製剤」の区別

- ②エリキシル剤：液状の剤形であるにもかかわらず、液剤から独立した剤形とされ、分類が不自然であった
- ③懸濁剤・乳剤：液状の剤形であるにもかかわらず、液剤から独立した剤形とされ、分類が不自然であった
- ④口腔内崩壊錠、チュアブル錠、発泡錠、分散錠、溶解錠など：臨床で汎用されているこれらの剤形は収載されていなかった
- ⑤リモナーデ剤：液状の剤形であるにもかかわらず、液剤から独立した剤形とされ、分類が不自然であった
- ⑥経口ゼリー剤：臨床現場で汎用されているにもかかわらず、収載されていなかった
- ⑦散剤と顆粒剤が粒度試験によって一律に規定されており、欧米の局方の取り扱いと異なっていた

そこで、日局16製剤総則では、固形剤 > 液剤 > 半固形剤 > … > 用途別の記載順の一般原則にしたがって、経口投与する製剤として、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、経口服液剤、シロップ剤、経口ゼリー剤の順に中分類し、さらにそれぞれの製剤に分類される特徴のある剤形をあげ、小分類した(図2)。

#### (1) 錠剤

日局15製剤総則では錠剤1つにまとめられていたが、新たに口腔内崩壊錠、チュアブル錠、発泡錠、分散錠、溶解錠を錠剤に含まれる特殊な剤形として小分類し、それぞれを定義するとともに、形状あるいは製法上の特徴を示し、さらに品質試験、および製剤の機能として有すべき「適切な製剤特性」を示した。

口腔内崩壊錠は、服用水なしでPK試験が行われ、水なしで服用できるのが利点であるので、「水なしでも服用できる」ことを定義に加えるべきという意見もあった



1. 経口投与する製剤		(JP15製剤)
1-1. 錠剤	←	15. 錠剤
素錠		糖衣錠
フィルムコーティング錠		フィルムコーティング錠
糖衣錠		多層錠
多層錠		有核錠
有核錠		
1-1-1. 口腔内崩壊錠		
1-1-2. チュアブル錠		
1-1-3. 発泡錠		
1-1-4. 分散錠		
1-1-5. 溶解錠		
1-2. カプセル剤	←	6. カプセル剤
硬カプセル剤		(1)硬カプセル剤
軟カプセル剤		(2)軟カプセル剤
1-3. 顆粒剤	←	7. 顆粒剤
1-3-1. 発泡顆粒剤		
1-4. 散剤	←	13. 散剤
1-5. 経口服液	←	3. 液剤の一部(内用)
1-5-1. エリキシル剤	←	5. エリキシル剤
1-5-2. 懸濁剤	}	11. 懸濁剤・乳剤
1-5-3. 乳剤		
1-5-4. リモナーゼ剤	←	27. リモナーゼ剤
1-6. シロップ剤	}	16. シロップ剤
1-6-1. シロップ用剤		
1-7. 経口ゼリー剤		

図2 日局16製剤総則における「経口投与する製剤」  
下線部は新たに規定した製剤

が、水なしの服用については窒息事故の原因となる危険性もあり、安全性を考慮して定義には入れず、「口腔内で速やかに溶解又は崩壊させて服用できる製剤」とした。また口腔内崩壊錠では、錠剤一般に必要な標準的製剤試験以外に、崩壊性は管理すべき重要な品質特性であるが、一律の崩壊試験法の設定は時期尚早ということで、「本剤は、適切な崩壊性を有する」という表現とした。

チュアブル錠は、「咀嚼して服用する錠剤」と定義するとともに、「服用時の窒息を防止できる形状とする」とした。

ドロップ剤という製剤名が使われることもあるが、「口腔内に適用する製剤」であるトローチ剤あるいはチュアブル錠に含まれるので、食品のドロップとの混同を避ける意味からも剤形名として用いなかった。

なお、錠剤では、製法による分類として、日局15製剤総則と同様にフィルムコーティング錠、糖衣錠、多層錠、有核錠をあげるとともに、新たにコーティングなしの素錠をあげた。

## (2) カプセル剤

日局15製剤総則の内容を踏襲し、製法あるいは貯法に関する記載整備にとどめた。

## (3) 顆粒剤

日局15製剤総則では、散剤と顆粒剤はそれぞれ「粉状に製したもの」および「粉状あるいは微粒状に製したもの」と定義し、製剤の粒度の試験に用いる篩の目の大きさの違いによって、一律に分類していた。しかし、この分類および定義は、欧米薬局方におけるGranuleとPowderの定義と異なる。そこで、日局16製剤総則では、顆粒剤は「経口投与する粒状に造粒した製剤である」とした。また従来、散剤に含まれるとされていた剤形である細粒についても、造粒されているということから、顆粒剤の一部に分類することとした(詳細は他の解説<sup>1)</sup>を参照)。

なお臨床で汎用されている発泡顆粒錠を顆粒剤に含まれる製剤としてあげ、定義および製法の特徴を記した。

## (4) 散剤

日局16製剤総則では、粒径による分類ではなく、造粒の有無で顆粒剤と分類し、「経口投与する粉末状の製剤」と定義した(詳細は他の解説<sup>1)</sup>を参照)。

なお、日局15製剤総則では触れられていなかったが、日局16製剤総則では医薬品の吸収に関わる重要な品質試験として、「溶出試験法への適合」を追記した。

## (5) 経口服液

日局15製剤総則では液剤は、内用剤、外用剤の両者を含む剤形として定義されていた。日局16製剤総則では液状の剤形として、「経口投与する製剤」としての経口服液剤、「皮膚に適用する製剤」としての外用液剤、さらに「鼻に適用する製剤」としての点鼻液剤をあげ、別の製剤として分類した。

経口服液には、経口投与する液状の剤形だけでなく、流動性のある粘稠なゲル状の製剤も含む製剤と定義した(一方、流動性のないゼリー状の製剤は後述する経口ゼリー剤とした)。液状の剤形だけでなく、流動性のある粘稠なゲル状の経口服液も経口投与後、容易に有効成分が溶出される剤形であるので、溶出試験は必要とされない。

なお、日局15製剤総則に記載されていたエリキシル剤、乳濁剤、乳剤、リモナーゼ剤は経口服液に含まれる特殊な剤形として小分類し、それぞれ定義するとともに、製

造方法の特徴，あるいは必要とされる製剤試験を記した。例えば，懸濁剤では，「溶出試験法に適合する」ことを追記した。

## (6) シロップ剤

日局16製剤総則ではシロップ剤は「経口投与する，糖類又は甘味料を含む粘稠性のある液状又は固形の製剤」と定義した。この定義は日局15製剤総則とほぼ同様であるが，日局16では，シロップ用剤(別名ドライシロップ)を取り上げ，「通例，用時溶解又は用時懸濁して用いる」，「水を加えるとき，シロップ剤となる顆粒状又は粉末状の製剤」と定義し，シロップ剤に含まれる剤形とした。

また日局16製剤総則では，通常の懸濁剤と同様に，懸濁したシロップ剤は「別に規定するもののほか，溶出試験法に適合する」とした。またシロップ用剤は，用時溶解する製剤以外については「別に規定するもののほか，溶出試験法又は崩壊試験法に適合する」とした。

## (7) 経口ゼリー剤

近年，嚥下障害のある高齢患者向けの製剤として各種の経口ゲル状製剤が開発され市販されており，日局16製剤総則ではこれら製剤を「経口投与する製剤」に分類される製剤として収載した。その際，流動性があり一定の形状をなさない粘稠なゲル錠製剤は，上に記したように「経口服液剤」に含まれるものとし，流動性のない成形したゲル状製剤は，「経口ゼリー剤」とした。

経口ゼリー剤は，溶出性，あるいは製品によっては崩壊性が吸収の律速となるので，経口服液剤に含まれるゲル状製剤と異なり，「別に規定するもののほか，溶出試験法に適合する。又は適切な崩壊性を有する」とした。

## 5 日局16製剤総則：「口腔内に適用する製剤」とは

日局15製剤総則に収載されている製剤では，口腔内に適用する製剤としては，エアゾール剤の一部，錠剤の一部，トローチ剤があげられる。一方，日局16製剤総則では，「口腔内に適用する製剤」を大分類の1つと位置づけ，これに含まれる製剤として，口腔用錠剤，口腔用スプレー剤，口腔用半固形剤，含嗽剤の順に中分類した(図3)。

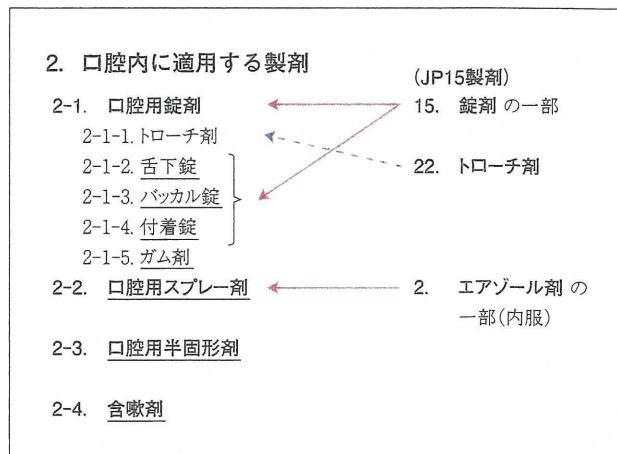


図3 日局16製剤総則における「口腔内に適用する製剤」  
下線部は新たに規定した製剤

### (1) 口腔用錠剤

口腔用錠剤は「口腔内に適用する一定の形状の固形の製剤」と定義した。口腔用錠剤に含まれる剤形として，日局15製剤総則に収載されていたトローチ剤のほか，新たに舌下錠，バッカル錠，付着剤，ガム剤をあげ，定義した。口腔用錠剤の場合，試験液のpH等の試験条件は異なるものの，「経口投与する製剤」の錠剤と品質確保に必要とされる試験項目等は同様である。

トローチ剤は日局15製剤総則にも収載されていた剤形であるが，日局16製剤総則では「口腔内で徐々に溶解又は崩壊させ，口腔，咽頭などの局所に適用する口腔用錠剤」と定義した。チュアブル錠と同様に，「服用時の窒息を防止できる形状とする」とした。

舌下錠は「有効成分を舌下で速やかに溶解させ，口腔粘膜から吸収させる口腔用錠剤」と定義した。

バッカル錠は「有効成分を臼歯と頬の間で徐々に溶解させ，口腔粘膜から吸収させる口腔用錠剤」とした。

付着錠は「口腔粘膜に付着して用いる口腔用錠剤」と定義し，ガム剤は「咀嚼により有効成分を放出する口腔用錠剤」と定義した。

### (2) 口腔用スプレー剤

日局15製剤総則ではエアゾール剤は「医薬品の溶液，懸濁液などを，同一容器又は別の容器に充てんした液化ガス又は圧縮ガスの圧力により，用時噴出して用いるように製したもので，外用塗布，空間噴霧，吸入，内服などの目的に用いられ，噴出形態にはこれらの目的に応じて霧状，粉末状，泡沫状，ペースト状などがある」とされ，口腔用スプレー剤をはじめとして，品質管理に必要とされる試験が異なるさまざまな剤形を含んでおり，日局15



製剤総則の問題点の1つであった。そこで、日局16製剤総則ではそれぞれの製剤を独立させ、口腔用スプレー剤は「口腔内に適用する製剤」に分類するとともに、「口腔内に適用する、有効成分を霧状、粉末状、泡沫状又はペースト状などとして噴霧する製剤である」と定義した。

また、口腔用スプレー剤の中で定量噴霧式製剤については、「別に規定するもののほか、適切な噴霧量の均一性を有する」とした。噴霧量の均一性は日局16では一般試験法として設定されていない製剤特性であるが、欧米の局方では試験法が設定されており、これらの試験法を参考にし、日局にも一般試験法の導入を急ぐべきものと考えられる。

### (3) 口腔用半固形剤

日局15製剤総則では触れられていなかったが、日局16では、「口腔内に適用する製剤」として、クリーム剤、ゲル剤や軟膏剤について、口腔用半固形剤として新たに収載した。

なお、本剤は、微生物の混入を防ぐ必要性の高い粘膜等に投与する製剤の1つであり、「多回投与容器に充てんするものは、微生物の発育を阻止するに足りる量の適切な保存料を加えることができる」とした。

また、製品ごとに個別の対応が必要と考えられるものの、製剤特性として「粘性」に言及し、「本剤は、口腔粘膜に適用する上で適切な粘性を有する」とした。

### (4) 含嗽剤

日局16製剤総則で新たに収載し、「口腔、咽頭などの局所に適用する液状の製剤である。本剤には用時溶解する固形の製剤が含まれる」と定義した。また分包品は「別に規定するもののほか、製剤均一性試験法に適合する」とした。

## 6 欧米薬局方あるいは米国FDA ガイダンスにおける口腔内崩壊錠

口腔内崩壊錠は日局16製剤総則に、「経口投与される製剤」の中の「錠剤」に含まれる剤形として収載された。この分類は欧米での分類と同様であるが、以下に米国薬局方(USP)と欧州薬局方(EP)における口腔内崩壊錠の取り扱い、さらには米国食品医薬品局(FDA)が発出している口腔内崩壊錠ガイダンスの内容に触れる。

### (1) USPにおける口腔内崩壊錠

USPでは日局製剤総則に相当する「医薬品剤形に関する章」<sup>3)</sup>(<1151>Pharmaceutical Dosage Forms)を改定中である。その改定案には、口腔内崩壊錠(orally disintegrating tablets)は、錠剤(TABLETS)に含まれる製剤と位置づけられており、「口腔内ですばやく崩壊し、懸濁物を飲み込む前に細かな分散状態となるように意図された錠剤」と定義されている。ただし、口腔内崩壊錠で必要とされる製剤試験については特に言及されていない。ただし、USPに収載されている製剤の各条をみると、崩壊性としてはUSP崩壊試験法<701>で60秒より速く崩壊するとされている製剤と、10秒より速く崩壊するとされている製剤がある。

### (2) EPにおける口腔内崩壊錠

EPでは日局製剤総則に相当する医薬品剤形に関する章<sup>4)</sup>(DOSAGE FORMS)の錠剤(TABLETS)の項に口腔内崩壊錠(orodispersible tablets)があげられており、「飲み込む前に、口腔内ですばやく分散するように意図された素錠」と定義されている。また崩壊性の試験については、EP崩壊試験法(2.9.1)で3分以内に崩壊するとされている。

### (3) 米国FDA口腔内崩壊錠ガイダンス

FDAは、2008年12月に口腔内崩壊錠の品質面に関する開発企業向けガイダンスを発出している<sup>5)</sup>。幼児や老人、あるいは嚥下が困難な患者、精神障害などのためコンプライアンスが難しい患者の処置にあたって有用であることを期待され、舌の上で簡単に服用できる製剤、すなわち唾液と接触することですばやく崩壊、溶出するように設計された製剤として口腔内崩壊錠が開発され、当初、このような口腔内崩壊錠を「舌の上に置いたとき、通常数秒以内ですばやく崩壊する医薬品活性成分を含んだ固形製剤」と定義した(1998年のCDER専門用語標準委員会)。しかし、その後、さまざまな技術・処方によって開発された製剤の当局への申請、審査の経験を加味し、これらの製剤の大多数は*in vitro*の崩壊時間はおよそ30秒あるいはそれ以下であったことから、上記定義に加えて「米国薬局方(USP)の崩壊試験あるいは代替法に基づいたとき、*in vitro*の崩壊時間はおよそ30秒あるいはそれ以下の時間で、口腔内ですばやく崩壊する内服固形製剤」と定義している。ただし30秒という値は望ましい数値ではあるが、口腔内崩壊錠を他の錠剤と区別するた



めの数字ではなく、重要なポイントは「水なし、あるいは噛まずに服用することを意図した崩壊錠として適切な性能上の特徴を持つ」ことにあるとしている。

その他、製剤開発の間に考慮すべき品質特性としては、錠剤の大きさ、錠剤の重量、成分の溶解性、さらにはこのような特性が製品の意図した使用に与える影響をあげている。錠剤の大きさは定義に入れていないが、錠剤重量は一般的には500mgを超えないことを推奨する。製剤設計上やむを得ず500mgを超える場合は、錠剤が口腔内崩壊錠として効果的に機能することを示すべきである。

口腔内崩壊錠においては崩壊性が重要な品質特性であり、どのくらいで崩壊するかをみる製品試験が必須となる。しかし崩壊時間は用いる試験法に依存する。FDAではUSPの崩壊試験法を推奨している。ただし、USP法と相関性があるか、あるいはUSP法と同等の結果を与えることが示された方法を代替法として認めるとしている。

## おわりに

口腔内崩壊錠の日局16における位置づけの理解の一助

として、日局16製剤総則における経口的に投与される製剤について、分類、定義、品質管理上、考慮すべき製剤特性について解説するとともに、欧米薬局方、あるいは品質ガイドンスにおける記載についてまとめた。口腔内崩壊錠等、患者にとっての服用性や利便性を高めた製剤開発は今後ますます活発化するものと思われる。これら製剤のうち臨床現場で汎用が予想されるものについては、その品質確保のためにも、公的な品質基準書への的確な収載に努めることが重要と考えている。

### ■参考文献

- 1) 川西 徹：製剤総則の改正概要およびその影響，PHARM TECH JAPAN, 27, 15-22(2011)
- 2) 医薬品医療機器レギュトリーサイエンス財団 編：日本薬局方技術情報2011, 11-19, じほう(2011)
- 3) <1151> Pharmaceutical Dosage Forms, *Pharmacopeial Forum*, 35, 1260-1310(2009)
- 4) DOSAGE FORMS, *European Pharmacopoeia 7.0*, 707-731 (2011)
- 5) Guidance for Industry: Orally Disintegrating Tablets, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) (2008)

# 第十六改正日本薬局方の

## 主な改正点

KAWANISHI Toru  
川西 徹\*

### はじめに

日本薬局方は薬事法によって「医療上重要と認められている医薬品の性状および品質などを定めた国定の医薬品規格基準集」と位置づけられる、法律に準じる基準書である。薬事法によって少なくとも10年に一度は全面改正することが求められており、第九改正（昭和51年）以降は5年ごとに全面改正が行われている（さらに第十二改正からは全面改正の間に2度の追補が発行されている）。その第十六改正日本薬局方（日局16）が2011年3月24日に告示された。日局16では医薬品を巡る環境の変化を反映した広範な改正が行われたが、本稿では日局16の主要な改正点を解説する。

### 日局16の作成基本方針

日局16に向けた改正作業を行うにあたり、平成18年7月に薬事・食品衛生審議会から厚生労働大臣あてに「第十六改正日本薬局方作成基本方針」が答申されている<sup>1)</sup>。この方針は、①保健医療上重要な医薬品の全面収載、②最新の学問・技術の導入による質的向上、③国際化の推進、④必要に応じた速やかな部分改正および行政による円滑な運用、⑤日本薬局方の改正過程の透明性の確保および日本薬局方の普及、の5つの柱からなる。

### 日局16の主な改正点

上記の基本方針に則り、日本薬局方を構成する通則、総則、一般試験法、医薬品各条、参考情報など

**Key words** 医薬品／公定書／品質管理／製剤

\* 国立医薬品食品衛生研究所副所長

について、数多くの改正が行われた。これらの改正の詳細については、別の総説、解説<sup>2,3)</sup>を参照いただくとして、本稿では特に日局16を特徴づける以下の改正点を取り上げる。

#### (1) 製剤総則の全面改正

##### 1) 製剤総則の改正理由

日本薬局方の製剤総則は医療現場で汎用される製剤を分類、定義し、それぞれについて製法、品質を保証するために必要な品質試験、品質を保持するための容器・包装、貯法などを示したものであるが、局方収載医薬品製剤にとどまらず、我が国で販売される医薬品製剤の基本的な品質要件となるものでもある。日本薬局方において製剤およびその関連品質管理事項を独立した製剤総則としてまとめ、主要な剤形を50音順に記載し、それぞれの定義、製法などを記した局方製剤総則のスタイルが完成したのは日局7（1961年施行）であるが、以後日局15までこのスタイルは引き継がれており、追加や部分的な改正を除いて、50年近くにわたって基本的な構成は変わっていない。そのため、(1) 臨床現場で汎用されている製剤で収載されていないものが少なくない、(2) 分類、定義が適切でない製剤がある、(3) 各製剤の品質管理に必要な試験などの記載が不十分などの問題が生じていた。そこで7年の検討期間をかけて日局16の告示にあわせて大改正した。

##### 2) 日局16製剤総則の構成および製剤の分類

日局15では、まず「1. 製剤通則」として製剤全般の共通事項が記載され、「2.」以下に50音順に剤形名およびその説明が列記されていた。日局16では日局15同様に「製剤通則」を〔1〕としてまとめたが、さらに〔2〕は「製剤各条」とし、大分類、中分類、小分類からなる剤形分類にしたがって剤形を列記する構成とした。

日局16製剤総則の最大の特徴はこの分類法にある。剤形をまず投与経路および適用部位別で大分類し、さらに剤形の形状、機能、特性から分類する方

日局16 製剤総則剤形名リスト

大分類：大型，中分類：普通，小分類：イタリック，灰色の背景色：新規記載の剤形

[2] 製剤各条

1. 経口投与する製剤

1.1. 錠剤

1.1.1. 口腔内崩壊錠

1.1.2. チュアブル錠

1.1.3. 発泡錠

1.1.4. 分散錠

1.1.5. 溶解錠

1.2. カプセル剤

1.3. 顆粒剤

1.3.1. 発泡顆粒剤

1.4. 散剤

1.5. 経口服液剤

1.5.1. エリキシル剤

1.5.2. 懸濁剤

1.5.3. 乳剤

1.5.4. リモナーゼ剤

1.6. シロップ剤

1.6.1. シロップ用剤

1.7. 経口ゼリー剤

2. 口腔内に適用する製剤

2.1. 口腔用錠剤

2.1.1. トローチ剤

2.1.2. 舌下錠

2.1.3. バッカル錠

2.1.4. 付着錠

2.1.5. ガム剤

2.2. 口腔用スプレー剤

2.3. 口腔用半固形剤

2.4. 含嗽剤

3. 注射により投与する製剤

3.1. 注射剤

3.1.1. 輸液剤

3.1.2. 埋め込み注射剤

3.1.3. 持続性注射剤

4. 透析に用いる製剤

4.1. 透析用剤

4.1.1. 腹膜透析用剤

4.1.2. 血液透析用剤

5. 気管支・肺に適用する製剤

5.1. 吸入剤

5.1.1. 吸入粉末剤

5.1.2. 吸入液剤

5.1.3. 吸入エアゾール剤

6. 目に投与する製剤

6.1. 点眼剤

6.2. 眼軟膏剤

7. 耳に投与する製剤

7.1. 点耳剤

8. 鼻に適用する製剤

8.1. 点鼻剤

8.1.1. 点鼻粉末剤

8.1.2. 点鼻液剤

9. 直腸に適用する製剤

9.1. 坐剤

9.2. 直腸用半固形剤

9.3. 注射剤

10. 腔に適用する製剤

10.1. 腔錠

10.2. 腔用坐剤

11. 皮膚などに適用する製剤

11.1. 外用固形剤

11.1.1. 外用散剤

11.2. 外用液剤

11.2.1. リニメント剤

11.2.2. ローション剤

11.3. スプレー剤

11.3.1. 外用エアゾール剤

11.3.2. ボンプスプレー剤

11.4. 軟膏剤

11.5. クリーム剤

11.6. ゲル剤

11.7. 貼付剤

11.7.1. テープ剤

11.7.2. パップ剤

[3] 生薬関連製剤各条

1. エキス剤

2. 丸剤

3. 酒精剤

4. 浸剤・煎剤

5. 茶剤

6. チンキ剤

7. 芳香水剤

8. 流エキス剤

日局15 製剤総則剤形名リスト

1. エアゾール剤

2. 液剤

3. エキス剤

4. エリキシル剤

5. カプセル剤

6. 顆粒剤

7. 丸剤

8. 眼軟膏剤

9. 経皮吸収型製剤

10. 懸濁剤・乳剤

11. 坐剤

12. 散剤

13. 酒精剤

14. 錠剤

15. シロップ剤

16. 浸剤・煎剤

17. 注射剤

18. 貼付剤

19. チンキ剤

20. 点眼剤

21. トローチ剤

22. 軟膏剤

23. パップ剤

24. 芳香剤

25. リニメント剤

26. リモナーゼ剤

27. 流エキス剤

28. ローション剤

図1 日局15および日局16製剤総則への製剤収載リスト



法を採用した。投与経路や適用部位により剤形を分類してみると、臨床で使用されている製剤の全体像を把握しやすくなるだけでなく、品質管理上の留意点にも共通点が多いため、規格基準書である日本薬局方として品質管理に必要な要件をまとめる上でも適切な分類法といえる。次いで大分類した剤形について、さらに形状などから主要な剤形を中分類し規定した。例えば経口投与する剤形については錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤などの主要な剤形に分類、あるいは別に大分類した製剤では含嗽剤や点鼻剤のような用途による剤形グループへの分類を行った。さらに中分類で規定された各々の剤形について、必要に応じて特徴のある剤形を規定して小分類した。例えば錠剤では口腔内崩壊錠、チュアブル錠、発泡錠などの特別な機能を有する剤形に分類し、経口液剤ではエリキシル剤、懸濁剤、乳剤のように特定の処方・製法による製剤グループに分類した。分類した剤形の記載順序は、汎用性、重要性、性状、用途を基準に優先順位をつけ、優先順位がつけられないものについては50音順とした。すなわち、大分類では、経口投与製剤>注射剤>…>皮膚適用製剤の順、中分類では、固形剤>液剤>半固形剤>…>用途別の順、小分類では口腔内崩壊錠>チュアブル錠>発泡錠>分散錠の順である。図1に日局16製剤総則で取り上げた剤形リストを、日局15製剤総則と比較して示した。

製剤各条にあげた剤形については、まず剤形の定義、次に製法、さらに品質管理上において当該製剤が有すべき製剤特性およびその試験、次に容器・包装および貯法について記した。剤形の定義は妥当なものについては極力日局15製剤総則の定義を踏襲したが、散剤、顆粒剤、軟膏剤などについては、合理性や国際的整合性に配慮し定義の変更を行った。

なお、主として生薬を原料とする製剤剤形である生薬関連製剤は、〔2〕製剤各条の後に、〔3〕生薬関連製剤各条としてまとめて記載した。

### 3) 剤形の定義の変更

日局15では、散剤と顆粒剤はそれぞれ「粉末又は微粒状に製したのもの」および「粒状に製したのもの」と定義し、製剤の粒度の試験に用いるふるいの目の大きさの違いにより、一律に分類していた。しかし、この分類および定義は製剤粒子の結合状態の強弱によって分類する欧米薬局方の定義と異なる。そこで、日局16では、造粒の有無で区別をすることとし、顆粒剤は「経口投与する粒状に造粒した製剤」、散剤は「経口投与する粉末状の製剤」とした。また、従来散剤に含まれるとされていた剤形である細粒についても、造粒されているという調査結果から、顆粒剤の一部に分類することとした（詳細は他の解説<sup>4)</sup>を参照）。

また、日局15ではクリーム剤は、「軟膏剤のうち通例、乳化した基剤を用いたものをクリーム剤と称することができる」と定義され、軟膏剤の一部とされてきたが、臨床上ではしばしば使い分けが必要であり、日局16ではクリーム剤は軟膏剤から独立した剤形とした。

## (2) 水各条に関する改正

### 1) 製薬用水の分類の見直し

日局15では「常水」、「精製水」、「滅菌精製水」、および「注射用水」の4種類の製薬用水（＝医薬品の製造に使用される水）が、医薬品各条に規定されていた。しかし、「精製水」および「注射用水」は製薬用水製造システムで製造され配管を通じて医薬品の製造設備に供給されるバルク状態の水（バルク水）と、これを容器に充填し製品として市場に流通する容器入りのもの（容器入りの水）とを、同一規格としてきた。このため、規格は複雑で、品質管理の上で必要な要件もわかりにくいものとなっていた。そこで、日局16では「精製水」は、バルク水を現行の各条名のまま「精製水」とし、容器に充填された製品は「精製水（容器入り）」とし、それぞれに必要な規格設定を行った（図2）。また、注射用水についても同様に対応した。滅菌精製水は、実態調査結果よりバルク水の設定はせず「滅菌精製水（容器入り）」とした。なお、表示への対応として、精製水（容器入り）、注射用水（容器入り）については、本質欄に「ただし、（容器入り）を省略して表示することができる」と記載するとともに、「滅菌精製水（容器入り）」は別名として「滅菌精製水」を用いることができるように手当した。

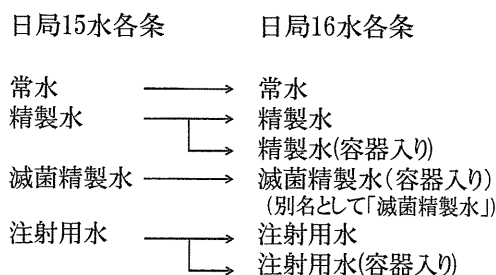


図2 日局15および日局16の水各条の関係

### 2) 製薬用水の各条の純度試験内容の見直し

精製水および注射用水の純度試験の規格について導電率および有機体炭素（TOC）により規定できないか検討を行った。その結果、バルク水については導電率 $2.1\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ （25℃）以下、TOC 0.50mg/L以下を限度値として設定することにより、それぞれ無機塩類および有機不純物を管理することが可能であることがわかり、日局15の無機塩類や過マンガン酸カリウム還元性物質試験をこの2項目に置き換えた。

各容器入りの水については、無機塩類は導電率を $5\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (25℃)以下(内容量が10mLを超える製品)、または $25\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (25℃)以下(内容量が10mL以下の製品)を採用することにより管理可能と判断した。一方、ゴム栓付きポリエチレン容器入りの場合などは、TOCは高値を示すことがあり、TOCを指標とした有機不純物の管理は困難であると結論し、容器入りの水の純度試験は、導電率と過マンガン酸カリウム還元性物質の試験とした。

### 3) 水各条の改正に伴う通則の改正および参考情報への手当

通則20の医薬品の試験に用いる水の定義を改正し、「医薬品等の試験に用いる水は、別に規定するもののほか、精製水とする」を「医薬品等の試験に用いる水は、試験を妨害する物質を含まないなど、試験を行うのに適した水とする」とした。これは「精製水」とすると、GMP管理の下で製造され医薬品製造に用いられる水をさすことになり、医薬品製造用の水の製造設備を持たない機関などでの運用が困難であることに対する対応である。ただし、参考情報「医薬品等の試験に用いる水」を新規記載し、その中で「精製水」、「精製水(容器入り)」などは医薬品などの試験に用いることが可であることを解説した。また、参考情報「製薬用水の品質管理」を整備・充実させた。

### (3) 生薬などの医薬品各条の成分含量測定法の項の改正

生薬などの医薬品各条について、「成分含量測定法」の項名を「定量法」に改め、あわせて成分の含量規定の項の記載を整備するとともに、関連する試薬・試液の名称および規格を整備した。(医薬品各条29項目、試薬・試液30項目の改正)

### (4) 試薬・試液の名称改正

日局15において、塩またはエステルである原薬の医薬品名称を変更した。それにあわせ医薬品各条の試験に原薬を試薬として用いている場合には、その試薬名称も変更する必要があるが、作業量が膨大であったため変更を見送ってきた。そこで日局16では、以下の改正方針で、その対応を行った。

- (1) 次のように試薬・試液名を変更する：1) アミンの無機酸塩又は有機酸塩は「○○○\*\*\*塩」と命名する〔(例)塩酸イミプラミン→イミプラミン塩酸塩〕；2) 第四級アンモニウム塩類は、「○○○\*\*\*化物」と命名する〔(例)塩化コリン→コリン塩化物〕。
- (2) 9.41 試薬・試液の条について名称改正を行うが、旧試薬名は「…を見よ」として残すこととする。この措置によって、旧試薬名を使用することを可

- 能とし、医薬品各条内の試薬の名称は変更しない。
- (3) JIS規格を引用している試薬については、JISとの不整合箇所を整備する。
- (4) 日局品を試薬としている場合には、原則として医薬品各条名を試薬名とする。
- (5) 日局品以外を試薬とする場合には、エステルおよび水和物などの試薬の名称については原則改正の対象としないが、水和物の数が記載可能な試薬については水和物の数を記載する〔(例)塩化ストロンチウム→塩化ストロンチウム六水和物〕。

### (5) JIS廃止試薬の規格案の作成

日本薬局方に記載されている試薬・試液では、その規格に日本工業規格(JIS規格)が引用できるものについてはJIS番号と等級(グレード)で規定していた。しかし、局方試薬・試液の中でJIS規格が廃止されるものが散見されるようになり、その対応を行った。日局16では、JIS規格が廃止されたものについて、局方に設定の必要のない(=日局での用途が不明、あるいは流通の実態がない)もの4項目(過塩素酸カリウム、酢酸ウラニル二水和物、 $\alpha$ -ニトロフェノール、マグネソン)を削除するとともに、41項目については具体的な規格・試験方法を設定した。なお、三酸化ナトリウムビスマスの確認試験で用いられている硝酸マンガン(II)六水和物[K8568, 特級]を追加した。

### (6) 溶出性の項の記載整備

溶出性試験は経口製剤について溶出試験規格に適合しているかどうかを判定するために行う医薬品品質管理試験の一つであるが、日本薬局方では「併せて著しい生物学的非同等性を防ぐことを目的としている」と位置づけている。このような溶出試験の重要性から、日局16では、新規収載品では規格設定の妥当性を確認し、日局15収載品で溶出規格が設定されていない製剤についてはそれらをリストアップし、溶出規格を設定する必要のない品目の確認を含めて、医薬品各条の溶出性の項を記載整備した。従来から日局に収載されていて溶出性の規格が設定されていなかった製剤については、4液性(pH1.2, pH4.0, pH6.8, 水)の試験液における溶出プロファイルの試験結果に基づいて溶出規格を設定した。新規収載品目では、日本薬局方外医薬品規格(局外規)第三部<sup>5)</sup>収載品目あるいは承認申請書に溶出性の規格がある製剤の場合はそれらを基本とし、試験条件が適切でないと思われる場合は、必要に応じて可能な範囲で修正して設定した。

### (7) 医薬品各条への収載品目数

新規収載品目は図3に示す通りであるが合計106品目にのぼった。また、改正した品目は330、削除数



は15であり、各条収載品目の合計数は1,764となった。

化学薬品	87
抗生物質	3
生物薬品	0
添加物	1 (トレハロース水和物)
生薬	15
合計	106

図3 日局16医薬品各条新規収載品目の分類

## おわりに

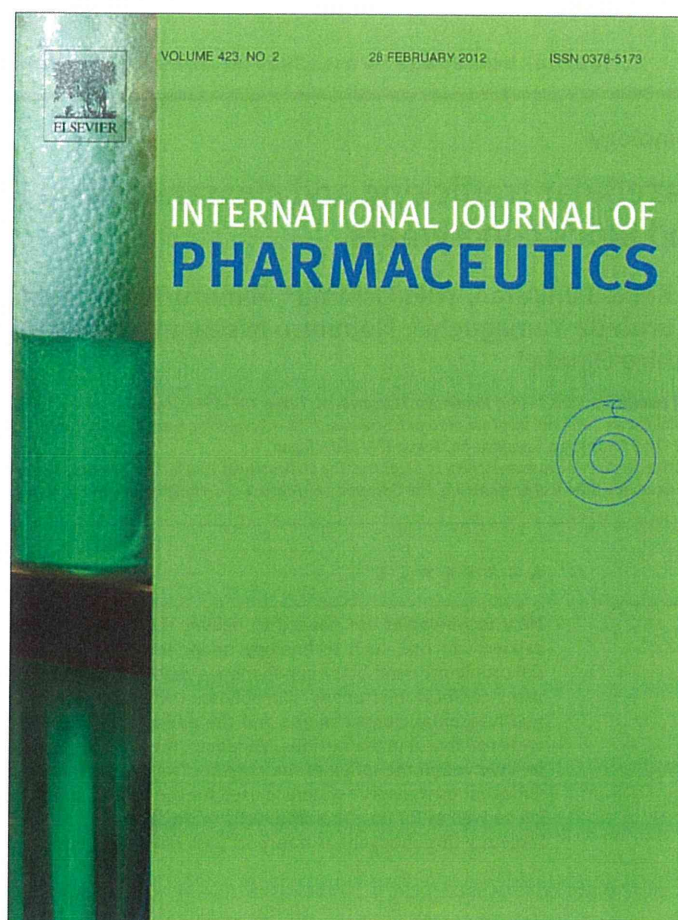
日本薬局方は医療、製薬企業、薬事行政、薬学研究、薬学教育などに携わる多くの薬剤師の皆様に、それぞれの場で活用していただく公共のものである。その改正は関係者の皆様の知識と経験およびご意見をもとに行われる作業である。現在、改正関係の情報は医薬品医療機器総合機構日本薬局方HP ([http://](http://www.pmda.go.jp/kyokuhou.html)

[www.pmda.go.jp/kyokuhou.html](http://www.pmda.go.jp/kyokuhou.html)) に随時公開されている。皆様には、日局16を実務などにおいてご活用いただくとともに、日本薬局方が我が国における適正な医薬品品質規範書であり続けるために、日本薬局方の今後の改正についてご意見をお寄せいただければ幸いである。

## 文献

- 1) 第十六改正日本薬局方作成基本方針 (平成18年8月3日厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡) ([http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/pdf/bulldata/H180803\\_0000000\\_01.pdf](http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/pdf/bulldata/H180803_0000000_01.pdf))
- 2) 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団編：日本薬局方技術情報2011 (JPTI2011), じほう (2011)
- 3) 特集第十六改正日本薬局方改正点, 薬局, 16 (No.6) (2011)
- 4) 川西徹：製剤総則の改正概要およびその影響 *Pharm Tech JAPAN*, 27, 15-22 (2011)
- 5) 厚生省医薬安全局長：日本薬局方外医薬品規格第三部の総説について (平成11年3月23日医薬発第343号) (<http://www.jp-orangebook.gr.jp/>)

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>