

■ 医薬品各条の改正点 —— ②

新規収載および既収載医薬品

Key Points

奥田 晴宏

国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長

- ⊕ 化学薬品を中心に汎用される医薬品270品目が新収載，427品目が改正された（生薬を除く）。
- ⊕ 医薬品原薬規格に残留溶媒「別に規定する」が導入された。
- ⊕ 結晶多形を利用した医薬品のライフサイクル戦略に対応し，赤外吸収スペクトル試験法による確認試験の考え方が修正された。
- ⊕ 製造工程の高度化および新しい技術の導入により，医療用ガスの規格が大きく更新された。

はじめに

第十五改正日本薬局方(日局15)作成と並行して，薬事・食品衛生審議会では第十六改正に向けて作成のありかたを議論し，2006年8月に厚生労働省医薬食品局審査管理課から，「第十六改正日本薬局方作成基本方針について」として事務連絡された。その内容は第十五改正時に示された内容を踏襲するものであり，第十六改正日本薬局方(日局16)作成の5本の柱として，①保健医療上重要な医薬品の全面的収載，②最新の学問・技術の積極的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及び行政によるその円滑な運用，⑤日本薬局方改正過程における透明性の確保及び日本薬局方の普及，が掲げられた。

この5本の基本方針に従い，保健医療上重

要な医薬品の全面的収載を目指し，さらに後発医薬品の規格の統一を図る観点からも，可能な限り速やかな収載を行うように検討することとなった。この方針を受けて，アシクロビル眼軟膏をはじめとする152品目が優先収載品目として選択され，別途製薬企業から収載希望のあった医薬品とともに収載に向けての審議が行われた。

日本薬局方の各条に収載される医薬品は5つの各条委員会(化学薬品委員会，抗生物質医薬品委員会，生物薬品委員会，添加物委員会，生薬委員会)で審議されている。

本稿ではこのうち，化学薬品および抗生物質医薬品に関して日局16の概要を紹介する。まず，新規および改正品目ならびに削除品目の概略を紹介したのち，新規収載および改正に際しての審議方針と注意点に関して記述する。さらに，近年局方が取り組みを開始した

製法依存的な医薬品特性に関する柔軟な対応の例として、医療用ガス、残留溶媒および結晶多形に関して紹介する。

新規収載品目および 既収載改正品目

新規収載医薬品数(ただし生薬を除く)を表1に示す。新規収載品目270品目であり、そのうち、化学薬品関連が227品目、抗生物質関連が38品目と、両者でその大部分を占めた。また優先収載品目として選択された品目は、日局15第二追補から収載が始まり、日局16と合わせて57品目(原薬20品目、製剤37品目)が収載された。

日局15では、生薬を除く新規医薬品の総数は149品目であり、そのうち化学薬品および抗生物質の数はそれぞれ、82品目および55品目であった。可能な限り医療上有用な医薬品を収載するという方針に従い、化学薬品を中心に大幅に新規収載が増大した。また、新規収載の半分以上は製剤であり、より臨床現場で実際に用いられる医薬品が収載されることとなった。

抗生物質は、原薬に関しては日本抗生物質医薬品基準(日抗基)および日本薬局方外規格(局外規)から、日局への移行が日局15までで終了したことから、今回収載された原薬は2

品目(ピペラシリン水和物およびタゾバクタム)であった。

一部改正された医薬品数リストと主な改正点(生薬を除く)を表2, 3に示す。日局15以降、製剤総則の各剤形に規定されている製剤試験は、原則として医薬品各条の各医薬品の規格として設定することとされている。この方針を踏襲し、日局15第一および第二追補では、固形製剤に関しては製剤均一性試験が、注射剤に関しては不溶性異物試験・不溶性微粒子試験・無菌試験の設定および/あるいはエンドトキシン試験が設定された。また、局外規第三部に収載されていた溶出規格は日局に設定された。日局16では多くの改正が実施されたが、主たるものは水各条の変更に伴う製造に用いる水の記載の変更(“容器入り”の追加)、製剤総則の大改正に伴う製造方法や粒度規定の見直し、含量を小数第1位まで記載することとしたための変更によるものである。

抗生物質医薬品の各条は、従来の日抗基の各条をそのまま踏襲したため、日局や現在の国際的な医薬品の管理の方策とは不整合がある部分もあった。このため、日局15から引き続き、各条の改正作業を実施し、相当数の品目が改正された。

表1 日局15第一および第二追補、日局16における新規収載品目数(生薬を除く)*

	化学薬品		抗生物質		生物薬品		添加剤	合計
	原薬	製剤	原薬	製剤	原薬	製剤		
日局15第一追補	37	23	1	19	0	0	1	81
日局15第二追補	44	35	1	15	3	0	0	98
日局16	32	56	0	2	0	0	1	91
総計	113	114	2	36	3	0	2	270

* 化学薬品には、容器入り水を含む。抗生物質は抗生物質委員会で審議医薬品のうち、非抗生物質を除いた。

表2 日局15第一および第二追補, 日局16において改正された既記載品目数(生薬を除く)

	化学薬品		抗生物質		生物薬品		添加剤	合計
	原薬	製剤	原薬	製剤	原薬	製剤		
日局15第一追補	14	59	6	2	1	2	6	90
日局15第二追補	13	45	3	10	2	2	18	93
日局16	26	180	14	14	1	0	5	240
総計	53	284	23	26	4	4	29	423

表3 日局15第一および第二追補, 日局16における主な改正点(生薬を除く)

	日局15第一追補	日局15第二追補	日局16
溶出試験の設定	0	13	18
製剤均一性試験の設定	21	19	1
不溶性異物試験・不溶性微粒子試験・無菌試験の設定	43	14	1
エンドトキシン試験の設定	13	12	1
含量の項の改正	0	0	109
水各条の改正に伴う製法の項の改正	0	0	49
製剤総則の改正に伴う製法の項の改正	0	0	30
製剤総則の改正に伴う粒度の項の削除	0	0	8

表4 日局15以降に削除された品目

日局15第一追補	日局16
<ul style="list-style-type: none"> ・スルフィンピラゾン ・スルフィンピラゾン錠 ・ツボクラリン塩化物塩酸塩水和物 ・ツボクラリン塩化物塩酸塩注射液 ・ホスフェストロール ・ホスフェストロール錠 	<ul style="list-style-type: none"> ・インスリン亜鉛水性懸濁注射液 ・結晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液 ・無晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液 ・シソマイシン硫酸塩 ・セファピリンナトリウム ・セフロキシムナトリウム ・ネチルマイシン硫酸塩 ・プフェキサマク ・プフェキサマククリーム ・プフェキサマク軟膏 ・プロタミンインスリン亜鉛水性懸濁注射液
日局15第二追補	
<ul style="list-style-type: none"> ・アミドトリゾ酸メグルミン注射液 	

削除品目

代替の医薬品の出現などにより医療上の必要性がなくなった医薬品22品目(うち化学薬品10品目, 抗生物質5品目, 生物薬品7品目)が削除された(表4).

新収載および既記載品目改正の審議方針

新規収載あるいは改正の方針に関して, とくに日局15の方針と大きく変わった点はない. 日局16作成基本方針の2番目「最新の学問・技術の積極的導入による質的向上」に基

づき第15改正に引き続き、各条の制定にあたっては下記の事項に取り組んだ(概要部分のみ抜粋)。

- ① 確認試験、純度試験、定量法等への最新の分析法の積極的導入
- ② 製剤試験規格(溶出性等)の設定
- ③ 製剤の新規収載に伴う既収載原薬の見直し
- ④ 製法に依存する不純物の規格設定の考え方の明確化や試験項目の合理的設定(ヒ素、重金属、類縁物質等)
- ⑤ 試験に用いる試料量、試薬・試液量及び溶媒量の低減化
- ⑥ 有害試薬の可及的排除
- ⑦ 通則に規定する「別に規定する」の適用による適切かつ柔軟な各条規格の設定(例：統一した規格試験を設定できない工程由来不純物や製剤試験の一部、知的所有権の一部で保護すべき内容)

以下、医薬品各条規格項目ごとに審議に際して考慮された点のうち、主要な事項を説明する。

1 含量規定

乾燥操作などを行ってから定量する場合、乾燥したものを定量し表示する方法と、乾燥操作は別途実施し、換算した乾燥物に対して表示する方法とが存在するが、各条収載に際しては統一することはせず、実際に実施されている作業を記載している。

2 示性値

製剤の浸透圧比は、処方依存性であるため規定する必要がある場合は「別に規定する」とされた。なお、日抗基に規定されていた製剤については、規格値が規定されている。

3 確認試験

官能基の定性反応試験：ハロゲン、ニトロなどの官能基が赤外吸収スペクトル試験(IR試験)で確認できる場合は、当該官能基に関する定性反応試験は採用していない。また、原薬の確認試験で、ほかの試験(IR試験など)でアミノ基が確認できない場合は、非特異的な試験ではあるが、ライネツケ塩によるアミンの確認試験を規定している。

紫外可視吸収スペクトル：参照スペクトルに関しては、200nm～220nmの領域は溶媒の吸収が強く存在するため除外し、同定には原則として220nm～400nmの範囲のスペクトルを用いることとしている。

4 純度試験

溶状：注射薬に用いる原薬の場合、一律に溶状が設定されていたが、設定の意義がない場合にはアレンドロン酸ナトリウム水和物のように、溶状を設定しないこととした。

類縁物質の規格(HPLC法の場合)：類縁物質個々の限度値を0.1%以下と規定した場合には、不純物総量の限度値を数値規定しないこととした。なお、個々の規格を0.1%以下と規定する場合であって、総量を規定する場合には、検出の確認を0.05%以下で実施することとした。

5 定量法

錠剤を定量する場合は、粉末にしたのち定量する方法を原則とした。まるごと溶かす場合は、吸着性があるもの、粉碎できないもの、吸湿性が著しいもの、健康被害を引き起こす可能性があるものなどとした。またサンプルサイズは20個を原則としている。なお、計算式を立てる際には、粉末とする場合には秤量した量中の定量成分が算出される式とし、粉碎せず全量溶解させる場合には1錠(カプセ

ル)中が算出される式とした。

6 システム適合性／検出の確認

一般試験法 液体クロマトグラフィーにおいては、定量性が必要とされる試験では、通常、規格限度値レベルの溶液を注入したときのレスポンスの幅を規定して、限度値付近でレスポンスが直線性をもつことを確認していることから、欧州薬局方で実施されているS/N比によるdisregard limitの設定は採用しなかった。今後の国際調和の結果によっては将来変更される可能性もある。

製造方法を反映した規格設定への対応

日本薬局方はわが国で流通している医薬品の公的な規格を定めることが目的である。一方、医薬品の不純物等の品質特性は、製造工程に依存し、特定の1つに規定することができない、あるいは規定することが適当でない特性も存在する。このようなケースに対して「別に規定する」として局方で対応するのではなく、個別品目の承認規格に設定することを可能にした。日局16では残留溶媒および結晶多形に関して、製造工程の違いに対応して「別に規定する」あるいは複数の処理を認めることとしたので、紹介する。また、医療用ガスは、特定の製造方法を想定し、また新しい技術を取り入れ、各条を大幅に改定したので、あわせて紹介する。

1 残留溶媒

医薬品中の残留溶媒は患者に利益をもたらさないことから、新医薬品では残留許容値が「医薬品の残留溶媒ガイドライン」で規定されている。一方、局方では主に品質保証観点から抗生物質を中心に「別に規定する」を含め、

15品目ほどに残留溶媒が設定されていた。

日局16新規収載品目では、原薬の残留溶媒の規格設定に関して、審議方針⑧に記載した「別に規定する」を適用し、局方としては個別の残留溶媒の規格を設定しないこととした。残留溶媒は製造工程で使用する有機溶媒、とくに最終精製工程で使用する溶媒に依存することから、きわめて製法依存的であり、残留溶媒を管理する必要がある場合には、日局で特定の溶媒のみを規格に設定するより、承認審査の過程で個別に残留溶媒の規格および試験法を(設定の是非を含めて)判断するほうが好ましいからである。

この方針は、日局15第二追補収載品目から取り入れられ、計73原薬の残留溶媒が「別に規定する」とされた(表5)。ただし、製造工程から判断して明らかに有機溶媒の残留が想定し得ない原薬については、残留溶媒の規格項目を設定していない。

上記方針を受けて、参考情報の記載が修正され、「『医薬品の残留溶媒ガイドライン』に、患者の安全のために勧告された残留溶媒の許容量が示されている。医薬品中の残留溶媒は、特別な場合を除き、この値を超えてはならない。医薬品の製造業者は『医薬品の残留溶媒ガイドライン』に規定されている許容量と自社製品中の残留量の実測値に基づいて対象となる残留溶媒に適切な規格限度値あるいは管理基準値を設定して、残留溶媒試験法に準じて自社製品の試験を行い、製造する医薬品の品質を確保することが肝要である」となった。すなわち、残留溶媒は、原則としてガイドラインの基準値を超えてはいけないことが明記され、適切な規格および試験方法の設定が必要であることとなった。

2 結晶多形

近年、医薬品のライフサイクル管理の一環

表5 残留溶媒「別に規定する」とした新規収載品目

・アシクロビル	・シノキサシン	・ブテナフィン塩酸塩
・アセチルシステイン	・ジフルコルトロン吉草酸エステル	・ブラゾシン塩酸塩
・アトルバスタチンカルシウム水和物	・シンバスタチン	・フルコナゾール
・アブリンジン塩酸塩	・スリンダク	・フルタミド
・アミオダロン塩酸塩	・セボフルラン	・フルトブラゼパム
・アムロジピンベシル酸塩	・ゾルピデム酒石酸塩	・フルドロコルチゾン酢酸エステル
・アルガトロバン水和物	・タクロリムス水和物	・フルボキサミンマレイン酸塩
・アレンドロン酸ナトリウム水和物	・タゾバクタム	・フレカイニド酢酸塩
・イブリフラボン	・ダナゾール	・ブレドニゾンリン酸エステルナトリウム
・イミダプリル塩酸塩	・タモキシフェンクエン酸塩	・プロパフェノン塩酸塩
・イルソグラジンマレイン酸塩	・チアプリド塩酸塩	・プロピベリン塩酸塩
・インダパミド	・テブレノン	・プロブコール
・エカベトナトリウム水和物	・テモカプリル塩酸塩	・L-プロリン
・エバスタチン	・テルピナフィン塩酸塩	・ベタキソロール塩酸塩
・カドララジン	・ドキサゾシンメシル酸塩	・ヘパリンカルシウム
・カルシトニン(サケ)	・トスフロキサシントシル酸塩水和物	・ベミロラストカリウム
・カルベジロール	・ドネベジル塩酸塩	・ベラプロストナトリウム
・カンデサルタン シレキセチル	・ドロキシドバ	・モサプリドクエン酸塩水和物
・キナプリル塩酸塩	・トロキシピド	・ラベプラゾールナトリウム
・グリクラジド	・ナテグリニド	・リスベリドン
・グリメピリド	・精製ヒアルロン酸ナトリウム	・リセドロン酸ナトリウム水和物
・クレボプリドリノゴ酸塩	・ピオグリタゾン塩酸塩	・レバミピド
・ケトコナゾール	・ピモジド	・レボフロキサシン水和物
・ゲファルナート	・フェキシフェナジン塩酸塩	・ロサルタンカリウム
・サルボグレラート塩酸塩		

として、結晶多形が盛んに利用されている。その結果、特定の結晶多形に関して特許を取得し、物質特許が失効したのちも、結晶多形特許が存続する状況が生まれてきた。

同一分子構造であっても、結晶形の違いによって安定性および溶出性あるいは製造性に差が生じ得る。そのため、結晶形は原薬の重要な品質特性であり、日局は原則として分子構造とともに結晶構造も反映するIR試験法を確認試験として設定している。

一方、たとえ結晶構造に差異が存在しても、

いったん溶解してしまえば、同一濃度でありさえすれば同一分子構造なので同一の薬理作用が期待されること、また製剤の溶出性および安定性は、製剤化技術によって調節し得ることから、結晶多形に特許が存在する品目を局方に収載する際には、特定の(先発企業の)結晶多形のみを許容する試験方法は好ましくないとされた。

このような判断に基づき、日局16では結晶多形に特許が存在する7品目の赤外吸収試験法について、表6に示す措置を採用した。

表6 結晶多形を有する品目の赤外吸収スペクトル法の記載

原 薬	試験法
サルボグレラート塩酸塩	両者のスペクトルは同一波数のところに同様の強度の吸収を認める(一般的なIR試験法の記載)。もし、これらのスペクトルに差を認めるときは、本品及びサルボグレラート塩酸塩標準品をそれぞれアセトンで加熱懸濁し、結晶をろ取り、乾燥したものにつき、同様の試験を行う。
ラベプラゾールナトリウム	両者のスペクトルは同一波数のところに同様の強度の吸収を認める(一般的なIR試験法の記載)。もし、これらのスペクトルに差を認めるときは、本品、又は本品及びラベプラゾールナトリウム標準品のそれぞれをエタノール(99.5)に溶かし、40℃でエタノールを蒸発し、残留物を55℃で24時間減圧乾燥したものにつき、同様の試験を行う。
アトルバスタチンカルシウム水和物	両者のスペクトルは同一波数のところに同様の強度の吸収を認める(一般的なIR試験法の記載)。もし、これらのスペクトルに差を認めるときは、別に規定する方法により再結晶し、結晶をろ取り、乾燥したものにつき、同様の試験を行う。
カンデサルタン シレキセチル	
ドネペジル塩酸塩	
ナテグリニド	
フェキソフェナジン塩酸塩	

すなわちサルボグレラート塩酸塩およびラベプラゾールナトリウムに関しては、すでに後発品が承認されており、先発会社の結晶多形以外の多形情報が存在することから、標準品あるいは参照スペクトルとスペクトルが一致しない場合の処理方法を具体的に記載した。

一方、アトルバスタチンカルシウム水和物以下5品目に関しては、先発会社原薬の医薬品情報しか得られないことから、標準品あるいは参照スペクトルとスペクトルが一致しない場合の処理方法を具体的に記載することを避け、「別に規定する」として、承認審査でその妥当性を確認することとした。

なお、標準品あるいは参照スペクトルと当該原薬のスペクトルが一致せず、別途後処理をして、スペクトルの一致を確認する場合(すなわち標準品と異なる結晶多形の原薬の場合)においても、製造者は一貫して特定の結晶多形原薬を製造しなければならないことは言うまでもなく、そのために、当該製造業者は承認申請時に自社原薬の結晶構造の一貫性を確認しうる試験方法(例えば、使用する原薬特有

の参照スペクトルまたは標準物質を、あらかじめ個別の承認書に規定したうえでIR試験を行い、その赤外吸収スペクトルと同一波数のところに同様の強度を認めることを確認する試験)を設定すべきである。

3 酸素・窒素・二酸化炭素

上記3種の医療用ガスは、確認試験、純度試験、定量試験などが大幅に改められ、最新の科学技術を反映させるとともに、製造製法を考慮した規格となった。

酸素および窒素に関しては、わが国では高純度のガスが製造可能な空気液化分離法で製造される酸素および窒素のみであることから、同分離方法で製造されることを前提として改正された。その結果、酸素に関しては「木片の燃えさしが直ちに燃えること」が確認試験から削除された。窒素についても「燃えている木片が消えること」が確認試験から削除された。また、二酸化炭素の純度試験も現在の製造法では混入は考えがたいことから削除された。

二酸化炭素に関しては、確認試験として二酸化炭素用ガス検知管が採用され、「木片の燃えさしが直ちに燃えること」が確認試験から削除された。さらに一酸化炭素に関する純度試験がガスクロマトグラフ法から検知管によ

る試験に置き換えられた。また酸素・窒素に関する純度試験も、他極(米国, 欧州)の局方にもなく、現在では不要であるとされ、削除された。

【総説】

第十六改正日本薬局方の主な改正点について

国立医薬品食品衛生研究所薬品部

奥田晴宏

1. はじめに

平成23年3月24日に第十六改正日本薬局方（以下、日局16）が告示された。

日局16作成に先立って、「第十六改正日本薬局方作成基本方針」が薬事・食品衛生審議会で検討され、答申された¹⁾。本答申では、日本薬局方は「公的・公共・公開の医薬品品質規範書」であると位置付けられている。すなわち、日本薬局方は、学問・技術の進歩と医療需要に応じて、我が国の医薬品の品質を適正に確保するために必要な規格・基準及び標準的試験法等を示す公的な規範書であること、さらに規範書としての性格のみならず、薬事行政、製薬企業、医療、薬学研究、薬学教育などに携わる多くの医薬品関係者の知識と経験を結集して作成されたものであり、それぞれの場で関係者に広く活用されるべき公共のものであること、それ故に、作成過程における透明性ととともに、国民に医薬品の品質に関する情報を開示し、説明責任を果たす役割が求められる公開の書であることが求められることが強調されている。

このような日本薬局方の性格を踏まえ、日局16作成の基本方針として、表1に示す「5本の柱」が設定された。

表1 日局16作成の5本の柱

- (1) 保健医療上重要な医薬品の全面的収載
- (2) 最新の学問・技術の積極的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及び行政によるその円滑な運用
- (5) 日本薬局方改正過程における透明性の確保及び日本薬局方の普及

表1の基本方針のもと、日局16では通則、製剤総則、生薬総則、一般試験法、医薬品各条および参考情報に関して多くの改正および追加が実施された。本稿では、50年ぶりに大改正された製剤総則および筆者が座長を務める化学合成医薬品各条に絞って、主要な改正点を解説する。

2. 製剤総則の改正

日局15までは、製剤総則は製剤全般に共通する事項（添加物等）を記載した製剤通則に引き続き、製剤名が「アイウエオ順」で解説されていた。収載された薬剤も伝統的な剤形にとどまり、新たに開発された剤形の収載は遅れていた。また通則の中で経口製剤に関する記述がなされているなど、かならずしも、体系だった記載ではないなど改善すべき点があった。

改正の必要は認識されていたものの改正が進まなかった理由として、製剤総則改定に中心的に携わった青柳博士は、以下のような問題点を指摘している²⁾。すなわち、日本薬局方では個々の製剤を明確に区分できるように定義するという不文律があり、硬直化した製剤の定義の原因となっており、たとえば、散剤と顆粒剤を粒子径で定義していたことはその典型的な例であること、さらに製剤総則は国内問題にとどまっていたことや本総則の改定は規制上の影響が大きかったことなどを指摘している。

製剤総則の改正に際しては、表1の基本方針のもと製剤の品質確保と薬事規制に及ぼす影響が考慮された。また日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）や薬局方検討会議（PDG）の活動などの国際調和活動にも対応し、欧州薬局方（EP）や米国薬局方（USP）の取り組みも参考にされると

ともに、製剤開発を妨げない規定となるような配慮がなされた。

日局16では、製剤通則には製剤全般に共通する事項や原則のみを記載し、さらに製剤各条の項を設け、医療現場で汎用されている多くの剤形を取り入れるとともに、体系的に分類した。さらに生薬に用いられる剤形（エキス剤、丸剤、酒精剤、浸剤・煎剤、茶剤、チンキ剤、芳香水剤及び流エキス剤）は生薬関連製剤各条として、アイウエオ順に収載することとした（別表1）。

2-1 製剤通則に関して：

容器・包装に関して、日局15では製剤各条に製剤ごとに「本剤に用いる容器は、○○容器とする」と一律に定められていたのに対して、日局16では製剤通則に「製剤の容器・包装は、製剤の品質確保と共に、適正な使用及び投与時の安全確保に適したものとす」との記述が追加され、適正な使用や投与時の安全確保の観点が盛り込まれた。また、薬剤に求められる容器・包装はその薬剤の特性によって異なることから、酸素や湿気、水分の蒸散の影響を受けやすい製剤はそれぞれ保護する特性を有する容器・包装（例えば脱酸素剤の装填や低気体透過性材料の使用）を使用できることとし、柔軟な対応を可能とした。

日局15の製剤通則で言及されていたパラメトリック・リリースの記載が日局16からは削除された。パラメトリック・リリースは、製造工程のバリデーション及び適切な工程管理とその記録の照査により品質を保証する品質管理手法であり、無菌性に関する品質管理の手法として「高度な水準での無菌性が恒常的に保証される場合には、出荷時の試験において、無菌試験を省略することができる」として推奨されていた。削除されても日局16の方針には変わりなく、通則12で工程のバリデーション、工程管理による品質保証と最終製品試験の省略に言及されており、製剤通則の記載は重複になると判断されたためである。

2-2 製剤各条の分類に関して

製剤各条では製剤は、大、中、小に3段階に分けて体系的に分類された。大分類としては、投与経路及び適用部位別に分類し、さらに中分類では、製剤の形状および剤形で分類し、さらに小分類と

して、機能性やその他の特徴で、適宜分類した。例えば、大分類「経口投与される製剤」では、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等が中分類され、さらに、錠剤の中で、口腔内崩壊錠やチュアブル錠等が小分類されるという、3段階の階層構造となっている。剤形ごとに、定義、製法、製剤品質特性（あるいは規格とその試験法）、容器及び包装と貯法が、この順で必要に応じて記載されている。なお、別表1に示された剤形は一般的に使用されているものを示したものであり、これら以外の剤形についても、必要に応じて、適切な剤形とすることができる。例えば、投与経路と製剤各条の剤形名などを組み合わせることにより、形状又は用途などに適した剤形名を使用することができるが、製剤総則の通則に明記されている。

この様に分類することによって、要求される品質特性が類似した剤形は基本的に分類上近い場所に位置するようになった。さらに新しい剤形（口腔内崩壊錠やチュアブル錠）を適切な位置に収載することが可能となった。

剤形に応じた製剤特性を規定することや、製剤特性は適切な試験により確認することが、製剤通則に規定されている。しかし、新たに収載された製剤各条では「適切な○○性を有する」ことが定められてはいるものの、その試験法が日本薬局方一般試験法に定められていない製剤試験も存在する。最終製剤の品質試験よりもむしろ、工程を管理することにより品質を保証してきた製剤もあり、新薬剤の品質試験の日本薬局方一般試験法への取り込みは今後の課題である²⁾。

2-3 定義が変更された剤形

この新たな分類に伴い、顆粒剤・散剤および軟膏・クリーム剤の定義が変更された。品質管理や医療現場での使用に直接関連する製剤の本質を重視したためである。

①顆粒剤・散剤

日局15では、散剤は、「医薬品を粉末又は微粒状に製したもの」であり、製造方法に関しても「適切な方法で粉末又は微粒状とする」ことが記載され、造粒された医薬品も含む定義となっていた。散剤と顆粒剤とを区別するものは、造粒されているか否かでなくその粒子径であり、散剤とは、「製剤の粒度の試験〈6.03〉を行う

とき、18号ふるいを全量通過し、30号ふるいに残留するものは全量の5%以下であること」が要件となっていた。

顆粒剤は、「医薬品を粒状に製したものであり、製剤の粒度の試験〈6.03〉を行うとき、10号ふるいを全量通過し、12号ふるいに残留するものは全量の5%以下であり、また、42号ふるいを通過するものは全量の15%以下である」とされていた。

日局16では、散剤は、経口投与する粉末状の製剤であり、顆粒剤は、経口投与する粒状に造粒した製剤であると定義され、両者の違いは粒子径ではなく、製造過程に造粒プロセスを含むか否かによることとなった。

このように定義を変更した理由は、造粒プロセスを経て製造される顆粒剤では、崩壊過程が溶出に影響を与えることがあるのに対して、散剤では粒子径が溶出性に影響を与えるため、品質管理の観点からは考慮すべき因子が両者で異なるからである²⁾。このように再定義することにより、顆粒剤や散剤の定義に粒度規定を有しないEPやUSPとも整合を図ることができた。

一方、定義を変更すると、既存の医薬品では散剤と称していた医薬品を顆粒剤と変更する必要が生じるため、現行の粒度規定による散剤の定義を救済措置として残している。即ち、顆粒剤の規定の中で「18号ふるいを全量通過し、30号ふるいに残留するものは全量の5%以下のものを散剤と称することができる」とされた。さらに「製剤の粒度の試験法〈6.03〉を行うとき、18号(850 μ m)ふるいを全量通過し、30号(500 μ m)ふるいに残留するものは全量の10%以下のものを細粒剤と称することができる」との規定を残し、細粒剤を存続させた。

②軟膏・クリーム

日局15では、軟膏剤は、「通例、適切な稠度

の全体を均質な半固形状に製した、皮膚に塗布する外用剤」であると定義され、また、「乳化した基剤を用いたものをクリームと称することができる」として、クリームも軟膏に含めて定義されていた。しかし医療現場では両者は異なる用途で用いられることが多いことから、日局16では軟膏剤とクリーム剤はそれぞれに定義された。即ち、軟膏は、「皮膚に塗布する、有効成分を基剤に溶解又は分散させた半固形の製剤」であるとされ、クリームは「水中油型又は油中水型に乳化した半固形の製剤」とされた。

3. 医薬品各条の改正

日局16では生薬を除き、270品目が新規に収載され(添加物2品目を含む)、18品目が削除された。表2に新規収載品目の内訳を示す。可能な限り医療上有用な医薬品の収載を目指すという方針に従い、化学薬品を中心に大幅に品目数は増大し、またその約50%は医薬品製剤であった。

日局16では、多くの各条が改正された。その中で最も影響の大きいものは水各条の改正であろう。日局15では製薬用水は常水、精製水、滅菌精製水、注射用水に分類されていたが、日局16では精製水および注射用水にそれぞれ、同(容器入り)が追加され、製薬用水製造システムで製造され、消費されるバルクとしての水と容器に入れて市場に供給される水の2種にわけることとなった。同時に滅菌精製水は滅菌精製水(容器入り)とされた。バルクとして用いられる水は有機不純物含量が低く、容器入りの水とは管理が異なることに対応したものであり、国際的にも整合性が取れたものとなった。水各条の改正に関しては小嶋茂雄博士による優れた総説があるので、そちらを参照していただきたい³⁾。

本稿では製造工程を反映した日本薬局方の取り組みの一例として、異なる製造方法で製造される

表2 日局16における新規収載品目の内訳*1

	化学合成薬品	抗生物質	生物薬品	合計
原薬	113	2	3	118
製剤	114	36	0	150
合計	227	38	3	268

*1 日局15から新たに収載された品目数、ただし生薬および添加物を除く

医薬品が存在する場合の各条における取扱を紹介したい。

3-1 異なる製造方法で製造される医薬品が存在する場合の各条における取扱

冒頭に述べたように、日本薬局方は規格・基準及び標準的試験法等を示す公的な規範書であり、その内容は公開され、公共のものとなるべきものである。一方、品質特性の中には、個別医薬品の製造方法に依存し、一つに特定することが適当でない場合も存在する。日本薬局方は、そのような場合に医薬品各条の試験では「別に規定する」とし、具体的な事項は薬事法に基づく承認の際に規定する余地を残している。日局16では医薬品原薬の残留溶媒および結晶多形について、製造方法に依存して製品によって異なる場合があるので、「別に規定する」として、異なる特性を持つ医薬品の存在を許容することとしたので、以下に記述する。

①残留溶媒の取り扱い

化学合成医薬品は製造工程で有機溶媒を使用し、最終原薬に持ち込まれ残存するケースが多く、残存する有機溶媒の種類は最終精製工程で使用する溶媒より主に決定される。残留溶媒は患者にとってベネフィットはないので、ICHガイドラインで、その残留溶媒のヒト健康へのリスクに応じて許容量が厳しく規制されている。日本薬局方は日局15第2追補から、有機溶媒を製造工程で使用している原薬に関しては、残留溶媒を規制することとし、その際に一律に残留する溶媒の種類と量を規定するのではなく、「別に規定する」とした。第16改正では計73品目に残留溶媒が「別に規定する」として設定された。

②結晶多形の取り扱い

化学合成医薬品原薬の中には結晶多形が存在するものが多い。結晶多形とは同一分子でありながら結晶中での分子の配列の仕方が異なるものをいう（日本薬学会薬学用語解説より）。それぞれの結晶多形が存在する場合、結晶構造の違いにより、溶解性、安定性や製造性が異なる場合が存在する。

近年、医薬品産業は、安定性や溶解性に大きな影響を与える結晶構造に関して、知的所有権を求め、特許を取得するケースが増大した。このような場合、たとえ先発会社の医薬品の物質

特許が失効していても、結晶多形に関する特許が有効である場合、日本薬局方に収載することが困難になる。何故ならば、日本薬局方は原薬の確認試験として、分子の構造のみならず、結晶構造を特定しうる試験方法である赤外吸収スペクトル測定法を採用してきたため、赤外吸収スペクトルにより結晶多形が先発会社の結晶形に限定されてしまい、局方に収載すると、製造会社が限定されてしまうからである。

結晶多形は溶出性等に影響するものの、一旦溶解してしまえば、結晶多形による違いはなく、同一の生物活性が期待されるはずである。さらに溶出性や安定性は製剤技術の改良により補うことが可能であることから、日局16では、結晶多形に特許が存在する7品目（サルボグレラート塩酸塩、ラベプラゾールナトリウム、アトルバスタチンカルシウム水和物、カンデサルタンシレキセチル、ドネペジル塩酸塩、ナテグリニド、フェキソフェナジン塩酸塩）に関して複数の結晶多形が許容できる方策を講じた。例えばアトルバスタチンカルシウム水和物以下の5品目に関しては、スペクトルに差を認めるときは別に規定する方法により再結晶し、結晶をろ取し、乾燥したものにつき同様の試験（IR試験）を行うこととして、結晶多形を変換して測定することが可能とした。なお、製造会社は自社で定めた特定の結晶形の原薬を恒常的に製造する必要があり、そのために自社の原薬の結晶多形の一貫性を保証可能な（自社の結晶多形を社内標準物質に設定するなど）試験方法を設定する必要がある。

4. おわりに

日本薬局方は1886年（明治19年）に第一版が発行されて以来、その間15回の大改訂を行い、今年で125年目を迎えた。日局16の収載品目数は1764品目であり、日局15に比べても281品目の増加である（なお、第一版は468品目）。単に各条品目が増えただけでなく、今回は実に50年ぶりに製剤総則が大幅に改正された。この改正により日本薬局方の製剤の分類は科学的・合理的になり、国際的にも整合性のある分類となった。

医薬品各条の記載内容も変わりつつある。管理しなければならない品質特性の中で、製造方法の

違いにより単一には定められない特性は、個別承認に委ねられるケースが増大した。医薬品品質の管理手法は、科学技術の進歩（例えば非破壊分析による工程内管理など）に伴い、多様化しつつあり、日本薬局方も次回（あるいはその後も視野に入れて）の大改訂に向けて準備を開始しつつある。

日本薬局方は薬事法41条で定められた公的な規

格基準書であり、医療、教育、生産等の様々な場面で活用されることを期待している。

参考文献

- 1) 平成18年7月26日 薬事・食品衛生審議会答申「第十六改正日本薬局方作成基本方針」(<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/yakkyoku/>)
- 2) 青柳伸男, 医薬品研究39, 741-759 (2008)
- 3) 小嶋茂雄, PHARMA TECH JAPAN 27 1519-1534 (2011)

別表1 第16改正日本薬局方による製剤の分類（生薬関連製剤を除く）

-
1. 経口投与する製剤 (Preparations for Oral Administration)
 - 1.1. 錠剤 (Tablets) : 経口投与する一定の形状の固形の製剤
 - 1.1.1. 口腔内崩壊錠 (Orally Disintegrating Tablets/Orodispersible Tablets) : 口腔内で速やかに溶解又は崩壊させて服用できる錠剤
 - 1.1.2. チュアブル錠 (Chewable Tablets) : 咀嚼して服用する錠剤
 - 1.1.3. 発泡錠 (Effervescent Tablets) : 水中で急速に発泡しながら溶解又は分散する錠剤
 - 1.1.4. 分散錠 (Dispersible Tablets) : 水に分散して服用する錠剤
 - 1.1.5. 溶解錠 (Soluble Tablets) : 水に溶解して服用する錠剤
 - 1.2. カプセル剤 (Capsules) : 経口投与する, カプセルに充てん又はカプセル基剤で被包成形した製剤
 - 1.3. 顆粒剤 (Granules) : 経口投与する粒状に造粒した製剤
 - 1.3.1. 発泡顆粒 (Effervescent Granules) : 水中で急速に発泡しながら溶解又は分散する顆粒剤
 - 1.4. 散剤 (Powders) : 経口投与する粉末状の製剤
 - 1.5. 経口服液剤 (Liquids and Solutions for Oral Administration) : 経口投与する, 液状又は流動性のある粘稠なゲル状の製剤
 - 1.5.1. エリキシル剤 (Elixirs) : 甘味及び芳香のあるエタノールを含む澄明な液状の経口服液剤
 - 1.5.2. 懸濁剤 (Suspensions) : 有効成分を微細均質に懸濁した経口服液剤
 - 1.5.3. 乳剤 (Emulsion) : 有効成分を微細均質に乳化した経口服液剤
 - 1.5.4. リモナーゼ剤 (Lemonades) : 甘味及び酸味のある澄明な液状の経口服液剤
 - 1.6. シロップ剤 (Syrups) : 経口投与する, 糖類又は甘味剤を含む粘稠性のある液状又は固形 (シロップ用剤) の製剤
 - 1.6.1. シロップ用剤 (Preparations for Syrups) : 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
 - 1.7. 経口ゼリー剤 (Jellies for Oral Administration) : 経口投与する, 流動性のない成形したゲル状の製剤
 2. 口腔内に適用する製剤 (Preparations for Oro-mucosal Application)
 - 2.1. 口腔用錠剤 (Tablets for Oro-mucosal Application) : 口腔内に適用する一定の形状の固形の製剤
 - 2.1.1. トローチ剤 (Troches/Lozenges) : 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
 - 2.1.2. 舌下錠 (Sublingual Tablets) : 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
 - 2.1.3. バッカル錠 (Buccal Tablets) : 有効成分を臼歯と頬の間に徐々に溶解させ, 口腔粘膜か

- ら吸収させる口腔用錠剤
- 2.1.4. 付着錠 (Mucoadhesive Tablets) : 口腔粘膜に付着させて用いる口腔用錠剤
- 2.1.5. ガム剤 (Medicated Chewing Gums) : 咀嚼により, 有効成分を放出する口腔用錠剤
- 2.2. 口腔用スプレー剤 (Sprays for Oro-mucosal Application) : 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
- 2.3. 口腔用半固形剤 (Semi-solid Preparations for Oro-mucosal Application) : 口腔粘膜に適用するクリーム剤, ゲル剤又は軟膏剤
- 2.4. 含嗽剤 (Preparations for Gargles) : 口腔, 咽頭などの局所に適用する液状の製剤
- 3. 注射により投与する製剤 (Preparations for Injection)
 - 3.1. 注射剤 (Injections) : 皮下, 筋肉内又は血管などの体内組織・器官に直接投与する, 通例, 溶液, 懸濁液若しくは乳濁液, 又は用時溶解若しくは用時懸濁して用いる固形の無菌製剤
 - 3.1.1. 輸液剤 (Parenteral Infusions) : 静脈内投与する, 通例, 100mL以上の注射剤
 - 3.1.2. 埋め込み注射剤 (Implants/Pellets) : 長期にわたる有効成分の放出を目的として, 皮下, 筋肉内などに埋め込み用の器具を用いて, 又は手術により適用する固形又はゲル状の注射剤
 - 3.1.3. 持続性注射剤 (Prolonged Release Injections) : 長期にわたる有効成分の放出を目的として, 筋肉内などに適用する注射剤
- 4. 透析に用いる製剤 (Preparations for Dialysis)
 - 4.1. 透析用剤 (Dialysis Agents) : 腹膜透析又は血液透析に用いる液状若しくは用時溶解する固形の製剤
 - 4.1.1. 腹膜透析用剤 (Peritoneal Dialysis Agents) : 腹膜透析に用いる無菌の透析用剤
 - 4.1.2. 血液透析用剤 (Hemodialysis Agents) : 血液透析に用いる透析用剤
- 5. 気管支・肺に適用する製剤 (Preparations for Inhalation)
 - 5.1. 吸入剤 (Inhalations) : 有効成分をエアゾールとして吸入し, 気管支又は肺に適用する製剤.
 - 5.1.1. 吸入粉末剤 (Dry Powder Inhalers) : 吸入量が一定となるように調製された, 固体粒子のエアゾールとして吸入する製剤
 - 5.1.2. 吸入液剤 (Inhalation Solutions) : ネブライザなどにより適用する液状の吸入剤
 - 5.1.3. 吸入エアゾール剤 (Metered-Dose Inhalers) : 容器に充てんした噴射剤と共に, 一定量の有効成分を噴霧する定量噴霧式吸入剤
- 6. 目に投与する製剤 (Preparations for Ophthalmic Application)
 - 6.1. 点眼剤 (Ophthalmic Preparations) : 結膜嚢などの眼組織に適用する, 液状, 又は用時溶解若しくは用時懸濁して用いる固形の無菌製剤
 - 6.2. 眼軟膏剤 (Ophthalmic Ointments) : 結膜嚢などの眼組織に適用する半固形の無菌製剤
- 7. 耳に投与する製剤 (Preparations for Otic Application)
 - 7.1. 点耳剤 (Ear Preparations) : 外耳又は中耳に投与する, 液状, 半固形又は用時溶解若しくは用時懸濁して用いる固形の製剤
- 8. 鼻に適用する製剤 (Preparations for Nasal Application)
 - 8.1. 点鼻剤 (Nasal Preparations) : 鼻腔又は鼻粘膜に投与する製剤

- 8.1.1.点鼻粉末剤 (Nasal Dry Powder Inhalers) : 鼻腔に投与する微粉状の点鼻剤
 - 8.1.2.点鼻液剤 (Nasal Solutions) : 鼻腔に投与する液状, 又は用時溶解若しくは用時懸濁して用いる固形の点鼻剤
- 9.直腸に適用する製剤 (Preparations for Rectal Application)
- 9.1.坐剤 (Suppositories for Rectal Application) : 直腸内に適用する, 体温によって溶解するか, 又は水に徐々に溶解若しくは分散することにより有効成分を放出する一定の形状の半固形の製剤
 - 9.2.直腸用半固形剤 (Semi-solid Preparations for Rectal Application) : 肛門周囲又は肛門内に適用するクリーム剤, ゲル剤又は軟膏剤
 - 9.3.注腸剤 (Enemas for Rectal Application) : 肛門を通して適用する液状又は粘稠なゲル状の製剤
- 10.膣に適用する製剤 (Preparations for Vaginal Application)
- 10.1.膣錠 (Tablets for Vaginal Use) : 膣に適用する, 水に徐々に溶解又は分散することにより有効成分を放出する一定の形状の固形の製剤
 - 10.2.膣用坐剤 (Suppositories for Vaginal Use) : 膣に適用する, 体温によって溶解するか, 又は水に徐々に溶解若しくは分散することにより有効成分を放出する一定の形状の半固形の製剤
- 11.皮膚などに適用する製剤 (Preparations for Cutaneous Application)
- 11.1.外用固形剤 (Solid Dosage Forms for Cutaneous Application) : 皮膚 (頭皮を含む) 又は爪に, 塗布又は散布する固形の製剤
 - 11.1.1. 外用散剤 (Powders for Cutaneous Application) : 粉末状の外用固形剤
 - 11.2.外用液剤 (Liquids and Solutions for Cutaneous Application) : 皮膚 (頭皮を含む) 又は爪に塗布する液状の製剤
 - 11.2.1.リニメント剤 (Liniments) : 皮膚にすり込んで用いる液状又は泥状の外用液剤
 - 11.2.2.ローション剤 (Lotions) : 有効成分を水性の液に溶解又は乳化若しくは微細に分散させた外用液剤
 - 11.3.スプレー剤 (Sprays for Cutaneous Application) : 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皮膚に噴霧する製剤
 - 11.3.1. 外用エアゾール剤 (Aerosols for Cutaneous Application) : 容器に充てんした液化ガス又は圧縮ガスと共に有効成分を噴霧するスプレー剤
 - 11.3.2. ポンプスプレー剤 (Pump Sprays for Cutaneous Application) : ポンプにより容器内の有効成分を噴霧するスプレー剤
 - 11.4.軟膏剤 (Ointments) : 皮膚に塗布する, 有効成分を基剤に溶解又は分散させた半固形の製剤
 - 11.5.クリーム剤 (Creams) : 皮膚に塗布する, 水中油型又は油中水型に乳化した半固形の製剤
 - 11.6.ゲル剤 (Gels) : 皮膚に塗布するゲル状の製剤
 - 11.7.貼付剤 (Patches) : 皮膚に貼付する製剤
 - 11.7.1.テープ剤 (Tapes/Plasters) : ほとんど水を含まない基剤を用いる貼付剤
 - 11.7.2.パップ剤 (Cataplasms/Gel Patches) : 水を含む基剤を用いる貼付剤
-

Rapid and Sensitive Method for Measuring the Plasma Concentration of Doxorubicin and Its Metabolites

Kumiko Sakai-Kato,^{*a} Kunie Nanjo,^a Toru Kawanishi,^b and Haruhiro Okuda^a

^aDivision of Drugs, National Institute of Health Sciences; and ^bNational Institute of Health Sciences; 1–18–1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158–8501, Japan.

Received September 9, 2011; accepted December 16, 2011; published online December 21, 2011

Doxorubicin is an anti-cancer drug with a wide therapeutic range. However, it and its metabolites cause severe side effects, limiting its clinical use. Therefore, measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites is important to study the dosing regimen of doxorubicin. We developed a rapid and sensitive method by ultra-high-performance liquid chromatography with fluorescent detection for measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites in small volumes (around 10 μ L), enabling repeated measurements from the same mouse. The sensitivity of 7-deoxydoxorubicinolone, a major metabolite of doxorubicin, increased about 5 times than those ever reported using conventional HPLC, and the run time was within 3 min. The area under the curve (AUC_{0-24h}) of doxorubicin was 5.9 μ g h/mL similar to the value of 4.16 μ g h/mL obtained previously using a conventional HPLC method. This method would provide information that could be used to refine the therapeutic approach to doxorubicin use.

Key words doxorubicin; metabolite; pharmacokinetics

The anthracycline doxorubicin is one of the most widely used anticancer agents, and it has a broad spectrum of activity against a variety of malignancies.^{1,2)} New formulation technologies to enhance the effectiveness and safety of this anticancer drug are currently being developed. For instance, long-circulating and sterically stabilized liposomes containing doxorubicin can markedly increase tumor-specific deposition of drugs and have been approved as clinical products.³⁾ However, the clinical use of doxorubicin is limited by the side effect of cumulative, dose-dependent, irreversible chronic cardiomyopathy caused by doxorubicin itself and its metabolites, and optimal dose schedules remain a matter of debate.⁴⁾ Therefore, measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites is important to study the dosing regimen of doxorubicin.

Mice are very useful small laboratory animals for nonclinical research and are often used for pharmacokinetic, pharmacological, or drug formulation studies of doxorubicin.^{5–7)} Blood collection from the tail vein is becoming popular from the perspective of animal protection, but it has the limitation of small sample volumes. Therefore, it is often difficult to perform repeat investigations in the same animal to assess time-dependent changes in plasma concentrations, and many mice have to be killed for whole blood collection at each time point.

In a previous study, we succeeded in developing a method for measuring intracellular concentrations of doxorubicin and its metabolites by using ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC).⁸⁾ The resolution, sensitivity, and speed of analysis dramatically increased with the use of 2- μ m particles in the stationary phase, high linear velocities for the mobile phase, and instrumentation that operates at higher pressures than those used in HPLC.^{9–11)} Specifically, the quantitation limit of doxorubicin was about 2 times lower than the limit ever reported using conventional HPLC, and run time was shortened from 20 min to within 3 min.^{12,13)} Because of the high sensitivity of our method and the small sample volumes (around 10 μ L) required, in the current study we were able to measure changes in the concentration of doxorubicin and its metabolites over time in a single mouse, thereby diminish-

ing the number of animals needed. This method would also have clinical utility, because the reduction of sample volumes and analytical times would decrease the burden of therapeutic drug monitoring (TDM) for patients.

Experimental

Drugs and Chemicals Doxorubicin hydrochloride, daunorubicin hydrochloride, and verapamil were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Doxorubicinol hydrochloride, and 7-deoxydoxorubicinolone were purchased from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Canada). Doxorubicinolone was synthesized from doxorubicinol by acidic hydrolysis (0.5N HCl) at 50°C for 24 h, and then extracted with chloroform by a liquid–liquid extraction method.¹⁴⁾ Stock solution of each chemical was prepared by weighing separately. The primary stock solution of each chemical was prepared in methanol at 0.35 or 0.1 mg/mL and stored at –80°C. The standard solutions for validation data were obtained by mixing each chemical with mouse blank plasma.

Preparation of Mouse Plasma Samples for HPLC Doxorubicin was administered at 10 mg/kg by tail vein injection into female Balb/c mice purchased from CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan). Blood was collected from the tail vein into heparinized capillaries 10, 20, 40, and 60 min and 2, 6, and 24 h after doxorubicin administration. Plasma obtained from the blood sample (about 10 μ L) was mixed with saline, 50% methanol, and ZnSO₄ (final concentration: 400 mg/mL) and centrifuged at 15000 g for 10 min in a microcentrifuge (Model 3740, Kubota Corp., Tokyo, Japan); the supernatants were then collected. Plasma and saline volumes were adjusted so that the concentration of each compound was within the calibration curve range. A 15- μ L aliquot of each supernatant was mixed with 5 μ L of the internal standard (daunorubicin, 10 μ g/mL in methanol), 22.5 μ L ice-cold methanol, and 7.5 μ L Milli-Q water, and filtered through a 0.20- μ m filter (Millex-LG, Millipore Corp., Tokyo, Japan). The filtrates were transferred to autosampler vials before UHPLC analysis. All experimental procedures were approved by the institutional

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

animal care and use committee.

HPLC Conditions High-throughput quantification of doxorubicin and its metabolites was performed in a Hitachi LaChrom ULTRA system equipped with an L-2160U pump, an L-2200U automated sample injector, an L-2300 thermostated column compartment, and an L-2485U fluorescence detector (Hitachi, Tokyo, Japan).⁸⁾

Samples were analyzed on a Capcell Pak C18 IF column (2.0×50mm; particle size, 2μm; Shiseido Corp., Tokyo, Japan). The mobile phase consisted of a mixture of 50mM sodium phosphate buffer (pH 2.0) and acetonitrile (65:27, v/v). The mobile phase was delivered at a rate of 300μL/min, and

the column temperature was maintained at 25°C. The fluorescence detector was operated at an excitation wavelength of 470 nm and an emission wavelength of 590 nm.

Pharmacokinetics Analysis Pharmacokinetics were analyzed by noncompartmental analysis using Phoenix WinNonlin V6.1 software (Pharsight Corporation, CA, U.S.A.).

Results and Discussion

Doxorubicin is mainly metabolized in liver, and the estimated metabolic pathway was shown in Fig. 1a. According to a report where human metabolism of doxorubicin was studied

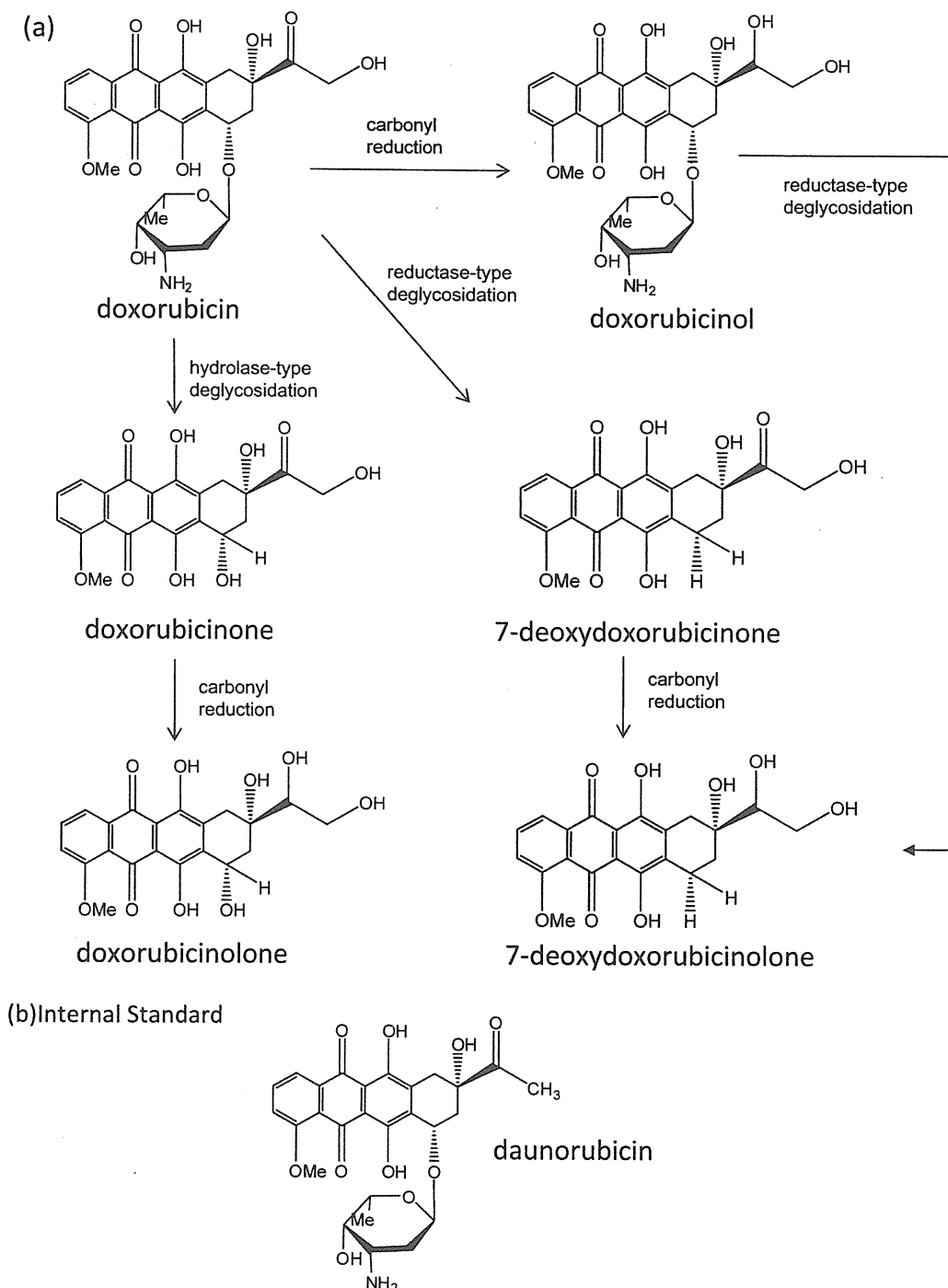


Fig. 1. Schematic Showing the Chemical Structures of Doxorubicin and Its Metabolites (a) and the Chemical Structure of Daunorubicin, the Internal Standard (b)

Table 1. Linearity of Doxorubicinone and Its Metabolites

	Slope			Intercept		r^2
	Mean	S.D.	Precision (%)	Mean	S.D.	
Doxorubicinol	12.71	0.22	1.73	0.0012	0.0062	1.000
Doxorubicin	12.16	0.19	1.56	-0.0009	0.0026	1.000
Doxorubicinolone	10.89	0.22	2.04	0.0029	0.0073	0.999
7-Deoxydoxorubicinolone	14.07	0.31	2.20	0.0049	0.0069	0.999

Precision (%): expressed as % R.S.D. (S.D./mean)×100.

Table 2. Detection Limit and Quantification Limit of Doxorubicin and Its Metabolites

	Doxorubicinol	Doxorubicine	Doxorubicinolone	7-Deoxydoxorubicinolone
Detection limit (pg)	3.8	4.9	6.4	7.4
Quantification limit (pg)	12.8	16.4	21.4	24.5

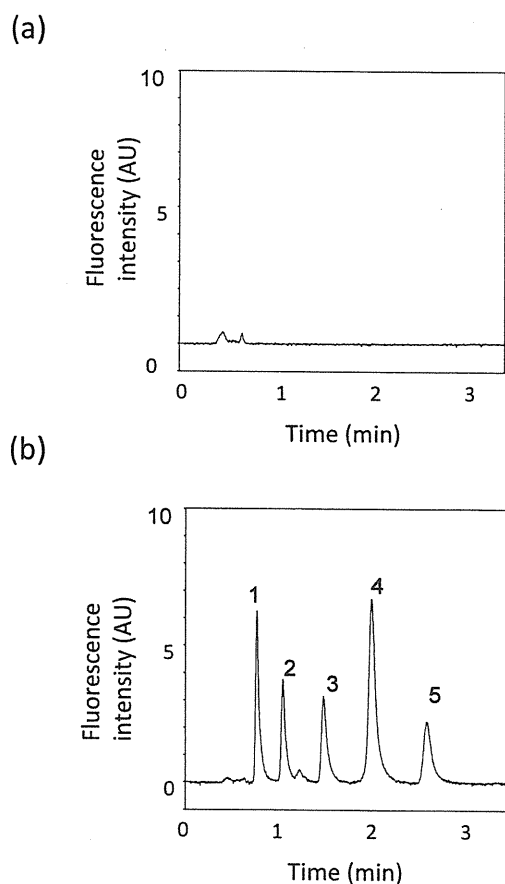


Fig. 2. Chromatograms of (a) Mouse Plasma and (b) Mouse Plasma Spiked with Doxorubicin and Its Metabolites

The chromatographic conditions are described in Experimental. AU; Arbitrary units. 1, doxorubicinol; 2, doxorubicin; 3, doxorubicinolone; 4, daunorubicin (internal standard); 5, 7-deoxydoxorubicinolone.

by isolating and identifying urinary metabolites, the metabolites retained doxorubicin's specific fluorescence properties.¹⁵⁾ Therefore, in this report, we used the fluorescent detection condition optimized for doxorubicin. Although the metabolites in human urine contained sulfate and glucuronide conjugates, which conjugate reactions also occur in liver, these conjugates were not detected in mouse plasma in our study. When a standard solution of doxorubicin, doxorubicinol, doxorubicinolone, 7-deoxydoxorubicinolone, and an internal standard (daunoru-

bicin (Fig. 1b)) was analyzed, all compounds were separated within 3 min with good resolution (Fig. 2). The chromatogram of mouse plasma demonstrates the lack of chromatographic interference from endogenous plasma components (Fig. 2a). In a chromatogram of plasma spiked with doxorubicin and its metabolites at a concentration of 20 ng/mL, no interfering peaks were observed, and doxorubicin, the three metabolites, and the internal standard were well separated (Fig. 2b). These results show that the specificity of this method. We created calibration plots for doxorubicin and its metabolites. The plasma calibration curve was constructed using six calibration standards (2.5–100 ng/mL). The plots of relative peak area to IS *versus* concentration were linear over a wide range of concentrations ($r^2=0.999$ –1.000) (Table 1). The detection limit and quantification limit were 3.8–7.4 pg and 12.8–24.5 pg injected compounds, respectively (signal to noise ratio, 3:1 for detection limits and 10:1 for quantitation limit). These values were 5 times lower than the limits ever reported using conventional HPLC^{12,13,16–19)} (Table 2).

We next tested the recovery of doxorubicin and its metabolites from mouse plasma spiked with each compound. The recovery rate was satisfactory, and the values for doxorubicinol, doxorubicin, doxorubicinolone, and 7-deoxydoxorubicinolone were 102.7, 92.6, 94.7, 96.7%, respectively ($n=3$). Tables 3 and 4 shows the accuracy and precision data for intra- and inter-day plasma samples. The assay values on both occasions (intra- and inter-day) were found to be within the accepted variable limits.²⁰⁾

The predicted concentrations for each analyte deviated within $\pm 15\%$ of the nominal concentrations in a series of stability test; in-injector (20h), bench top (6h), repeated three freeze/thaw cycles and at -80°C for at least 2 weeks (Table 5). Although 7-deoxydoxorubicinolone was slightly unstable under in-injector (20h; 91.24%), other compounds were stable at any storage conditions.

We then used the validated method described above for the simultaneous detection of doxorubicin and its metabolites in mouse plasma after intravenous administration of doxorubicin. Doxorubicin and its metabolites doxorubicinol and 7-deoxydoxorubicinolone were detected in the plasma sample. Although doxorubicinolone has been also reported to be produced by NADP-dependent cytochrome P450 reductase,^{13,15)} it was not detected in this study (Fig. 3). Doxorubicinol is produced by cytosolic carbonyl reductase through the

Table 3. Intra-Day Assay Precision and Accuracy for Doxorubicin and Its Metabolites in Mouse Plasma

ng/mL	Doxorubicinol				Doxorubicin				Doxorubicinolone				7-Deoxydoxorubicinolone			
	Mean	S.D.	Precision	Accuracy	Mean	S.D.	Precision	Accuracy	Mean	S.D.	Precision	Accuracy	Mean	S.D.	Precision	Accuracy
5	5.12	0.41	8.08	102.45	4.98	0.15	3.03	99.56	4.82	0.61	12.73	96.30	4.70	0.44	9.42	93.90
25	25.16	1.40	5.55	100.63	25.46	0.88	3.47	101.84	23.56	1.39	5.92	94.24	25.75	1.25	4.84	102.99
100	99.78	0.94	0.94	99.78	99.55	0.99	1.00	99.55	99.49	1.21	1.22	99.49	99.47	1.13	1.14	99.47

Precision (%): expressed as % R.S.D. (S.D./mean)×100. Accuracy (%): calculated as (mean determined concentration/nominal concentration)×100.

Table 4. Inter-Day Assay Precision and Accuracy for Doxorubicin and Its Metabolites in Mouse Plasma

ng/mL	Doxorubicinol				Doxorubicin				Doxorubicinolone				7-Deoxydoxorubicinolone			
	Mean	S.D.	Precision	Accuracy	Mean	S.D.	Precision	Accuracy	Mean	S.D.	Precision	Accuracy	Mean	S.D.	Precision	Accuracy
5	5.13	0.16	3.04	102.51	5.35	0.49	9.18	107.05	5.31	0.35	6.55	106.18	4.95	0.11	2.25	98.95
25	24.31	0.68	2.81	97.24	23.74	0.38	1.59	94.96	24.84	0.42	1.69	99.34	24.56	0.37	1.52	98.24
100	99.83	0.48	0.48	99.83	100.11	1.13	1.13	100.11	100.39	0.32	0.32	100.39	99.83	0.44	0.44	99.83

Precision (%): expressed as % R.S.D. (S.D./mean)×100. Accuracy (%): calculated as (mean determined concentration/nominal concentration)×100.

Table 5. Stability Data in Mouse Plasma

	Doxorubicinol				Doxorubicin				Doxorubicinolone				7-Deoxydoxorubicinolone			
	Mean	S.D.	Precision	Accuracy	Mean	S.D.	Precision	Accuracy	Mean	S.D.	Precision	Accuracy	Mean	S.D.	Precision	Accuracy
5 ng/mL																
20 h (in-injector)	5.00	0.068	1.37	100.06	5.22	0.072	1.37	104.30	5.19	0.058	1.12	103.86	4.56	0.074	1.62	91.24
6 h (bench-top)	5.19	0.10	2.01	103.71	5.43	0.11	2.08	108.66	5.22	0.11	2.01	104.38	4.92	0.073	1.48	98.39
2 weeks at -80°C	4.72	0.12	2.43	94.36	5.23	0.14	2.62	104.54	5.21	0.082	1.58	104.20	4.98	0.092	1.84	99.59
3rd freeze-thaw	4.80	0.17	3.49	96.00	5.16	0.18	3.51	103.23	5.01	0.22	4.48	100.19	4.97	0.154	3.09	99.42
50 ng/mL																
20 h (in-injector)	51.27	1.48	2.89	102.53	54.10	2.07	3.82	108.20	47.08	1.54	3.28	94.16	50.69	1.77	3.49	101.38
6 h (bench-top)	53.78	2.90	5.39	107.55	52.12	2.76	5.30	104.25	49.66	2.27	4.56	99.32	54.33	2.36	4.33	108.66
2 weeks at -80°C	47.75	0.54	1.13	95.49	48.10	0.47	0.97	96.21	49.04	0.35	0.71	98.08	47.99	0.44	0.91	95.98
3rd freeze-thaw	52.09	0.81	1.56	104.18	51.04	0.81	1.59	102.08	48.68	0.95	1.96	97.37	51.52	0.86	1.68	103.04

Precision (%): expressed as % R.S.D. (S.D./mean)×100. Accuracy (%): calculated as (mean determined concentration/nominal concentration) ×100.

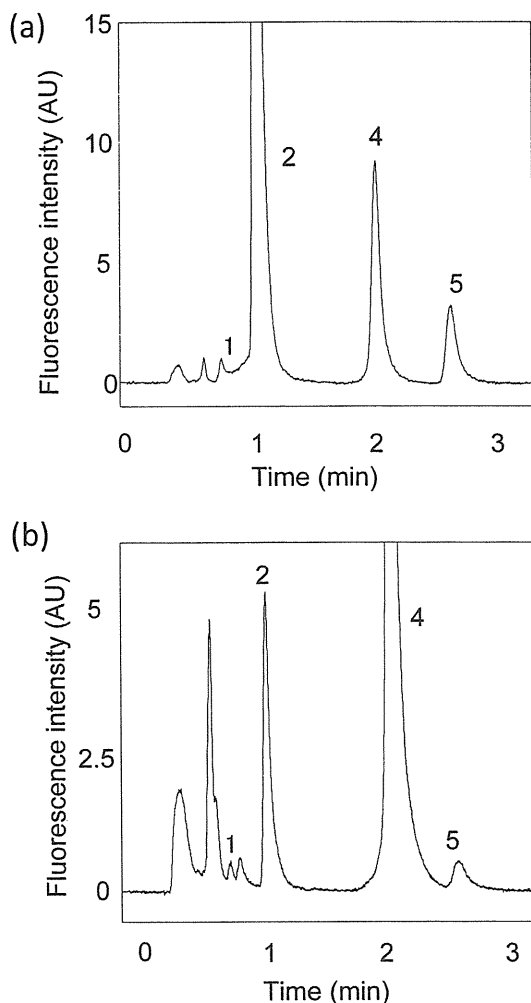


Fig. 3. Chromatogram of Mouse Plasma Obtained after Intravenous Administration of Doxorubicin

Doxorubicin (10mg/kg) was administered by tail vein injection. Blood was removed from the tail vein after 10min (a) and 6h (b) of administration, and plasma was prepared as described in Experimental. 1, doxorubicinol; 2, doxorubicin; 4, daunorubicin (internal standard); 5,7-deoxydoxorubicinolone.

NADPH-dependent aldo-keto reduction of a carbonyl moiety in doxorubicin¹⁵; deglycosidation at the daunosamine sugar in doxorubicin or doxorubicinol produces 7-deoxydoxorubicinolone^{15,21} (Fig. 1a). The major metabolites we detected were coincident with those reported previously.²² We also examined the time course of changes in the concentrations of doxorubicin and its metabolites (Fig. 4a). After an initial rapid decrease, the doxorubicin concentration decreased slowly, and the plasma concentration of doxorubicin was 74.2ng/mL (6h) and 61.1ng/mL (24h) ($n=3$). The persistence of doxorubicin indicates that doxorubicin comes back very slowly from some distributed tissues or circulates for a relatively long time by binding to plasma proteins.¹⁵

The area under the curve (AUC_{0-24h}) and C_{max} of doxorubicin was $5.9\mu\text{g h/mL}$ and $10.0\mu\text{g/mL}$, respectively, similar to the value of $4.16\mu\text{g h/mL}$, and $5.4\mu\text{g/mL}$ obtained previously using a conventional HPLC method.⁷ In addition, our method enabled us to trace the change in doxorubicin concentration over time in a single mouse (Fig. 4b); this had previously been difficult to do because of the small sample volumes. This property will allow us to minimize the number of animals

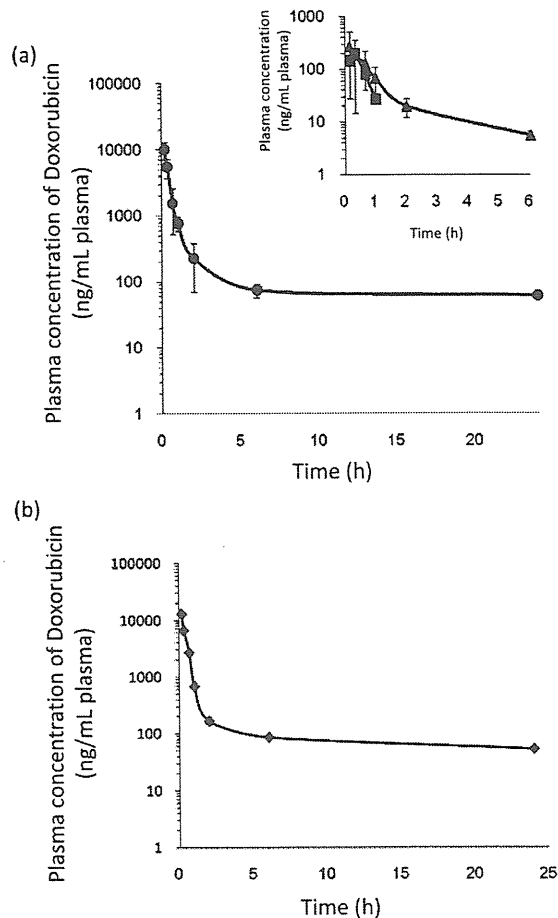


Fig. 4. Changes in Plasma Concentration over Time

Blood was collected from tail veins 10, 20, or 30min or 1, 2, 6, or 24h after administration of doxorubicin, and the drug concentrations in the plasma were measured. (Averaged results from 3 mice (a) and result of one mouse (b)); Main graph, doxorubicin. Inset, metabolites (squares: doxorubicinol; triangles: 7-deoxydoxorubicinolone).

needed for pharmacokinetic analyses. Furthermore, in a clinical setting, the small blood sample volumes and fast analytical time would reduce the impact of TDM on patients.

Conclusions

Our results show that the method we developed using UHPLC provides rapid analysis using very small plasma samples. The method is sensitive enough to evaluate changes in the concentrations of doxorubicin and its metabolites in a single mouse; this will result in the use of smaller numbers of animals, which is good for animal protection. In clinical applications, this method could also decrease the burden of TDM for patients. We predict that it will greatly facilitate studies of doxorubicin pharmacokinetics and clarify the effect of doxorubicin metabolism on therapeutic outcome.

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, Labour, and Welfare (MHLW); and KAKENHI (21790046) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) of Japan.