

PATの可能性を探る

周囲の分子環境によりスペクトルが影響を受けることがあり、この現象が吸収の帰属をはじめとするスペクトル解析を難しくする要因となる。特に水素結合によるバンド幅の広がりや非常に多数の倍音、結合音への遷移の重なりにより、バンド幅の広い非常に複雑なスペクトルが得られることがある。一方、測定対象が固形試料の場合、得られるNIRスペクトルには、粒度(粒径)、硬さ(密度)、充填密度などの物理的情報も反映される¹⁰⁾。このような近赤外領域の電磁波がもつ分光学的特性から、NIRスペクトルの解析には、ケモメトリクス(多変量解析)や2次元相関分光法のような情報を引き出すための方法が採用されることが多く、NIR分光法のさまざまな分野での普及発展に伴いこれらの手法に関する研究も活発に行われている。このようにNIRスペクトルは、吸収のオーバーラップや周囲の分子環境により影響を受けるために、その扱いが難しい半面、周囲の分子環境の変化などを鋭敏にとらえることが可能であり、振動分光・分子科学研究においては非常に魅力的な分析ツールの1つであるといえる。

医薬品の品質評価のためにNIR分光法を用いる場合、前述したようなスペクトルの解釈の問題が存在するものの、NIR分光法の普及拡大に伴って多くの分子振動情報が得られるようになり、吸収バンドの帰属も難しいものではなくなった。特に、医薬品原薬のようにほぼ単一化合物で構成される試料の場合は、その化合物の化学構造を反映する官能基情報を得ることができる。例えば、赤外(中赤外)分光法やラマン分光法とは得られる分光情報は異なるが、基本的にはNIRスペクトルにおいても同様に吸収の特異性を確保することはできる。ただし、ケモメトリクスを用いたスペクトル解析アプローチの場合では、分析種由来の化学情報を直接的に見出すアプローチと比較して、一般的に特異性は低くなるが、これはNIR分光法だからということではない。

2. NIR分光器による錠剤含量測定と課題

(1) In-line測定におけるスペクトル変動要因とその対策

錠剤中の主薬成分の含量など、定量的適用を目指した分析の場合、試料に照射されるNIR光の範囲が結果に影響を与える。例えば、拡散反射による測定では、試料の

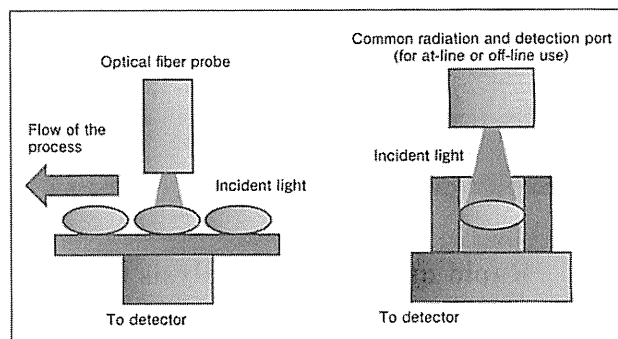


図1 In-line(左側)およびat-lineまたはoff-line(右側)におけるNIR光照射部および検知部のイメージ

均質性が確保されていることを前提としてスペクトル情報と含量を関連付けることも可能と思われるが、一般的には錠剤の透過光を用いる方法が定量的測定を行う上では適している。ラボ用の装置では、錠剤をホルダーに取りつけることで光路を一定とし、透過光を漏らさずに検知部へと到達させる方法を用いることが多い。一方、プロセスでのIn-line測定を想定する場合には、錠剤ホルダー等の治具を取りつけた測定を行うことは困難であり、ライン上の錠剤への直接的なNIR光の照射および透過光の検知を行わなければならない(図1)。このため、定量結果にさまざまな要因が影響することを考慮し、得られる結果の変動が、測定のタイミングや錠剤の動きに起因する光路長の変化などの測定の問題によるものなのか、あるいは試料の問題なのかを識別する方策を講じる必要がある。

(2) 定量的適用における(分光)分析バリデーション

新規に設定する分析法においては、日本薬局方あるいはICH Q2で提唱されている分析法バリデーションに基づく分析能の評価(フルバリデーション)が実施される。これは設定される分析法がクロマトグラフィーによる方法なのか、あるいは分光法による方法なのかという区別ではなく、確認試験、定量試験など分析法の目的に応じた分析パラメータの選定が重要であり、定量的適用においては、例えば、真度、精度、直線性、定量限界などの項目について評価を行うことが推奨されている。したがって、NIR分光法を用いる場合でも原則的にこれらの分析能パラメータを評価することが望ましい。

NIR分光法でよく用いられるケモメトリクスを用いたスペクトル解析アプローチでは、濃度依存性をもつ化学情報を直接的に得ることが困難であることが多く、液体

クロマトグラフィー (HPLC) などの対照分析法を用いて得た解析結果との相関を基に定量性が示されることが一般的である。基本的には、対照分析法に対する予測誤差がNIR分光法を用いて構築した検量モデルの評価に重要な役割をもつ。また、ケモメトリクスによる予測精度を向上させるためにはサンプル数を増大する必要があり、測定結果を常に検量モデルに反映(学習)させて、ある時期ごとに更新していかなければならない。実際に工程管理などにおいて定常的にNIR分光法による定量法を用いる場合には、人的および時間的資源の制約のなかで効率的な定量試験の運用を行うことは厳しいものとなるかもしれない。

さらにIn-line分析などで用いる場合には、測定結果を速やかに工程に反映するためにも迅速なスペクトル解析を行うことが望ましいと思われる。そこで、筆者らは簡便でかつ客観的な評価が容易なスペクトル解析アプローチを示すことを考えた。

分析法バリデーションの評価においては、クロマトグラフィーと同様に標準(基準)サンプルを用いる方法を採用した。分析対象の製剤と主薬を同含量となるようにした臭化カリウム錠剤を作製し、標準錠剤とした。臭化カリウムはNIR測定範囲において吸収をもたないため、製剤と同含量の主薬からのNIRスペクトルを得ることができ、このスペクトルを標準(基準)スペクトルとして扱うことが可能であった。今回の検討では、定量に用いた吸収における吸光度を“合意された真値”として真度の評価を行った。その他の分析能パラメータについては、一般的な手順に従い評価を行った。

3. 高速透過型NIR分光器を活用した錠剤含量測定とPAT導入への可能性

以下に筆者らが行った研究内容について概要を紹介する。

(1) 装置および実験方法

装置は、新規に開発した高密度InGaAsフォトダイオードアレイ検出器を採用したポリクロメーター方式の分散NIR分光器(プロトタイプP-NIRs, 横河電機製)¹¹⁾を用いた。測定波長、波長分解能、積算回数(平均化回数)は930nm~1,735nm ($10,752.7\text{cm}^{-1}$ ~ $5,763.7\text{cm}^{-1}$), 1 nm,

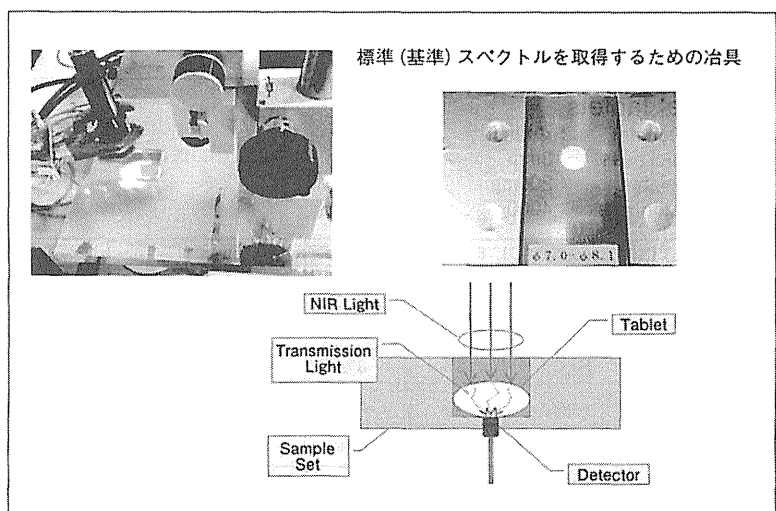


図2 本研究で用いたNIR光の照射・検知部と標準(基準)スペクトル取得のために作製した治具

積算回数は1回にそれぞれ設定した。NIR光照射部は錠剤の径(8mm)に合わせて照射光が当たるように調節し固定した(図2)。錠剤は錠剤透過用治具に固定またはステージ上に静置(治具なし)し、錠剤上方からNIR光を照射し、錠剤下部より透過光を受光した。本測定条件において、適切な透過光を得るための測定時間は約1秒であった。

全透過光を得るための治具は、アルミ板を8.0mmの径となるように精密に穴を開けて製した。本研究で調製したモデル錠剤は8.1mmΦの穴を用いて測定した。この治具を用いることにより、錠剤の全透過光を検知部に導入した。治具を用いる測定は、すなわちラボ用の装置を用いる際の錠剤ホルダーと同じ役割を果たす。これによりIn-line測定に供する実装置を用いて標準スペクトルを適切に得ることが可能であった。

モデル製剤はアセトアミノフェン、乳糖一水和物、コーンスターチ、HPC-Lおよびステアリン酸マグネシウム(医薬品原末および医薬品製造用のグレードのものを用いた)を実処方に基づき、エーザイにおいて調製したものを用いた。

アセトアミノフェン10.0mgをとり、臭化カリウム190.0mgに加えて十分にかき混ぜ、錠剤成形器に入れて製したペレットを基準スペクトル測定用ペレット(標準錠剤)として用いた。本ペレットから得た $8,802\text{cm}^{-1}$ (C-H伸縮振動の第二倍音)の二次微分吸収の値($n=6$)とモデル錠剤(10w/w%濃度)の測定で得た当該波長における二次部分吸収の値($n=6$)について差を求め、その差の90%信頼区間を算出し、真度の評価を行った。

PATの可能性を探る

表1 検量モデル用錠剤の処方

Model tablets		8% Tab	9% Tab	10% Tab	11% Tab	12% Tab
Diameter	: Φ 8mm					
Thickness	: 3mm					
Weight	: 200mg					
Batch size	: 4000g					
Ingredient		8% Tab	9% Tab	10% Tab	11% Tab	12% Tab
API	Acetaminophen	8%	9%	10%	11%	12%
Diluent	Lactose monohydrate	73%	72%	71%	70%	69%
Binder	HPC-L	3%	3%	3%	3%	3%
Disintegrator (Internal)	LH-21	5%	5%	5%	5%	5%
Disintegrator (External)	LH-21	10%	10%	10%	10%	10%
Lubricant	Magnesium Stearate	1%	1%	1%	1%	1%
合計		100%	100%	100%	100%	100%

検量モデル構築のための錠剤の調製については、アセトアミノフェンを10w/w%の濃度含む錠剤を中央濃度とし、8w/w%~12w/w%の5水準の錠剤を調製した。1錠あたりの質量は200mgとなるようにし、仕込み量は各水準において4,000gとした。添加剤のなかで含量の高い乳糖水和物については、主薬成分の量の増加に伴い増加しないように留意し、また、その他の添加剤は各水準において添加量を一定とすることで、主薬成分の濃度に対する非共線性を確保した。各水準におけるアセトアミノフェンおよび添加剤の処方を表1に示した。錠剤は攪拌造粒後、整粒したものを打錠して製した。

スペクトル解析は単回帰解析と多変量解析を行い、両者を比較した。

単回帰解析については、アセトアミノフェンに由来するC-H第二倍音を選択し、スペクトル前処理としてSNV正規化および二次微分処理(Savitzky-Golay, Smoothing point : 31point)を行った¹²⁾。各スペクトルの解析およびスペクトル前処理は、ソフトウェアThe Unscrambler 10.1(Camo Software, Oslo, Norway)を用いて行った。

多変量解析は、Moving Window Partial Least-Squares Regression (MWPLSR)¹³⁾法を用いて行った。ソフトウェアはMATLAB R2011b(Mathworks, Massachusetts, USA)を用いた。

また、HPLCを用いて錠剤中アセトアミノフェンの定量を行い、NIR測定結果と比較した。

(2) 実験結果

① 工程内(In-line)測定における透過光の減衰

In-lineでの測定の場合では、製造ライン上に設置した

装置を用いて錠剤を測定することが想定される(図1)。Off-lineまたはAt-lineでの測定で一般的に用いられる市販装置では、一般的に錠剤を保持する治具を用いることでほぼすべての透過光が検知できるように設計されている。一方で、In-line測定の場合では、錠剤を取り囲むような導波路を用いて全透過光を検知する機構を製造ラインに設置することは現実的ではなく、図1左図に示したような非保持の状態で測光することが、可能性として考えられる。このような光路では、試料の透過光が確実に検知部に到達することが困難となることも予想され、得られる分光情報の再現性に影響が生

じることが懸念される。さらにIn-line分析中に発生したスペクトルの変化が錠剤の品質に由来するのか、不適切な分光情報の取得に起因するものなのか識別できなければならない。これらの観点から、スペクトル解析の逸脱が生じた際に判断の基準となるスペクトルを得る必要があるものと考えられた。また、基準となるスペクトルの設定は、In-lineにおいて得られる透過光の減衰率等を算出することにもつながるため、In-line定量分析に係る装置導入の適格性確認のための背景データにもなり得るものと考えられた。このため、照射されたNIR光を錠剤からの全透過光を受光部に到達させるための治具を作製した。治具を設置せず得た吸収と設置して得た吸収を比較すると、約1.6倍の強度の違いが観察された。また、錠剤を透過し検知部で検知される透過光は、治具を用いずに測定した場合には、治具を用いて測定した際の透過光と比較して、約63%に減衰することがわかった。

② (分光)分析バリデーション

設置条件における分光測定の妥当性を確認するため、ICH Q2および日本薬局方参考情報で提唱されている分析法バリデーションに準じた評価を実施し、提唱されている分析能パラメータのうち、特異性、直線性(範囲)、真度、精度(併行精度)を評価の対象とした。

i) 特異性

モデル錠剤の構成成分の中で含量の高い乳糖一水和物、コーンスターチおよびアセトアミノフェン標準物質から得た各NIRスペクトルを図3に示す。第二倍音領域において、アセトアミノフェンと他の添加物が重ならない吸

RMSEP)は0.099%であった。

iii) 真度

基準スペクトル測定用ペレットとモデル錠剤(10w/w%)から得た $8,802\text{cm}^{-1}$ 付近の二次微分吸収強度(それぞれ $n=6$)の平均値はそれぞれ -2.71e^{-4} と -3.53e^{-4} であった。また、これらの二次微分吸収値の差の90%信頼区間は $-8.46\text{e}^{-6}\sim 8.46\text{e}^{-6}$ であった。両者の差の信頼区間に0を含んでいることから、真度は良好であると考えられた。

一方、直線性の評価で得た一次回帰式の y 残差(3.84e^{-16})の90%信頼区間は $-0.029\sim 0.029$ であり、基準スペクトルを用いた差の信頼区間により真度を算出した場合と異なる範囲を示した。この結果について、単

回帰解析による吸光度-濃度相関が広い濃度範囲では非線形となるためと推察している。しかしながら、本研究においては、 y 残差は 3.84e^{-16} と極めて小さい値であり、また信頼区間に0を含んでいたことから同様に良好な真度を示しているものと考えられる。この結果は吸光度-濃度相関において優れた直線性を示すことを示唆するものであり、単回帰解析による定量も可能であるものと考えられた。

本研究ではNIR光に吸収をもたない希釈剤を用いて製剤と同じ濃度のペレットから得た基準スペクトル(吸収)を用いる方法により、クロマトグラフィーなどを用いた分析法のバリデーションで用いられることがある、“合意された真値との差”による真度の評価を行うことが可能であった。

iv) 精度(併行精度)

直線性の評価で用いたモデル錠剤から得た 8802cm^{-1} の二次微分吸収の値(10w/w%に対応する値)の相対標準偏差(Relative Standard Deviation ; RSD) ($n=30$)は2.76%であった。

③ 多変量解析

ベースライン補正のためにS-Golay二次分処理を行った透過スペクトルについて、MWPLSR解析を行ったところ、 $8,718.4\text{cm}^{-1}\sim 9,354.5\text{cm}^{-1}$ の範囲で相関性の高い波数領域を示した。この波数範囲における相関係数は0.99、RMSEPは0.088%であった。この波数領域は、単回帰に

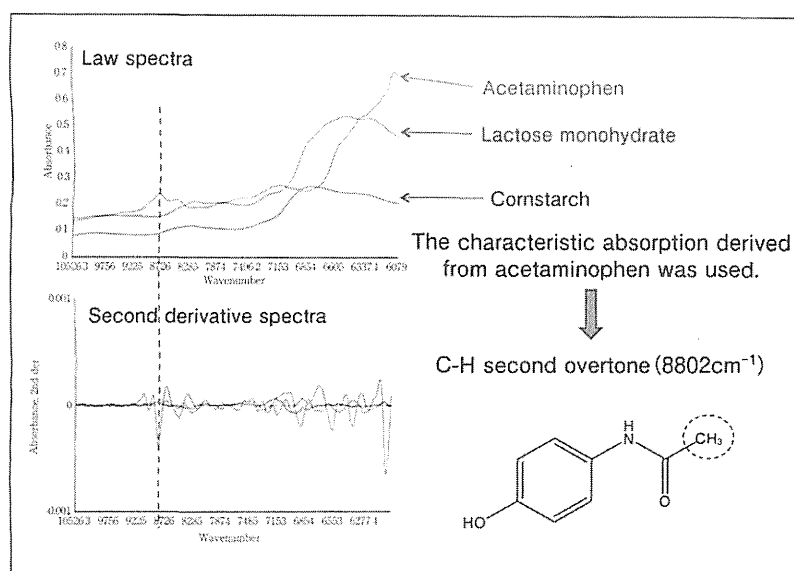


図3 各標準物質から得た透過NIRスペクトル

取(ピーク位置 $8,802\text{cm}^{-1}$)を見出すことができた。この吸収はアセトアミノフェンの化学構造とグループ振動からC-H第二倍音と帰属することができた。

ii) 直線性(範囲)

アセトアミノフェンの含量8w/w%~12w/w%までの5水準のモデル錠剤(各水準 $n=6$)から得た、 $8,802\text{cm}^{-1}$ 付近の二次微分吸光度から得た回帰直線を図4に示す。一次回帰式は $y=-0.00008x+0.00049$ 、相関係数は0.99と良好な直線性を示した。本検量モデルにおける二乗平均平方根誤差(Root Mean Square Error of Calibration ; RMSEC)は0.094%、クロスバリデーションによる予測二乗平均平方根誤差(Root Mean Square Error of Cross Validation ; RMSECV)は0.094%、また予測二乗平均平方根誤差(Root Mean Square Error of Prediction ;

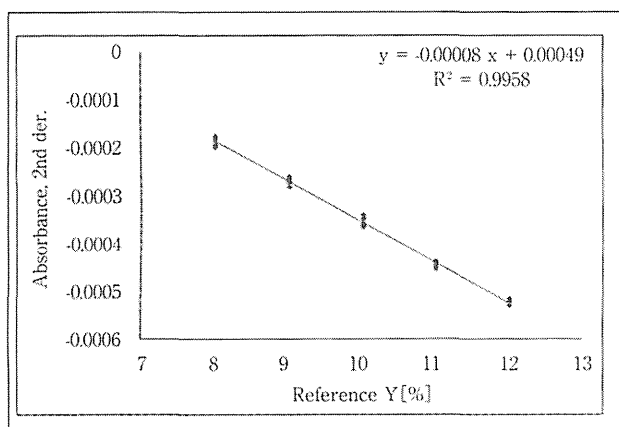


図4 錠剤中の主成分由来の $8,802\text{cm}^{-1}$ の吸収の二次微分値と濃度の相関

PATの可能性を探る

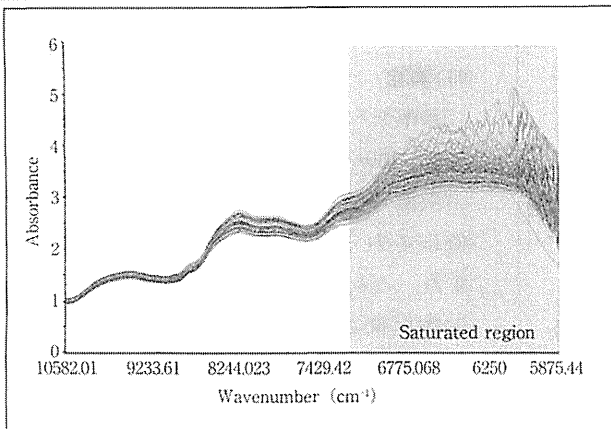


図5 アセトアミノフェン錠から得た透過NIRスペクトル
(含量 8w/w%~12w/w%, n=30)

より得たアセトアミノフェン由来のC-H第二倍音の吸収とはほぼ一致するものであり、多変量解析による予測が適切になされていることを裏付けている。

④HPLCによる定量

5水準のモデル錠剤(各水準n=6)から得た定量値を用いた検量線の一次回帰式は $y=0.5037x+0.015$ 、相関係数は0.983であった。また、これらの定量値の標準偏差(SD)は0.093、RSD(%) (n=30)は1.86%であった。

⑤錠剤の透過含量測定

錠剤から得られた透過NIRスペクトルを図5に示す。透過NIRスペクトルにおいて、 7150cm^{-1} より低波数の領域では、吸収の飽和が観察された。したがって、第一倍音を含めた低波数領域のNIR分光情報は適切に得られな

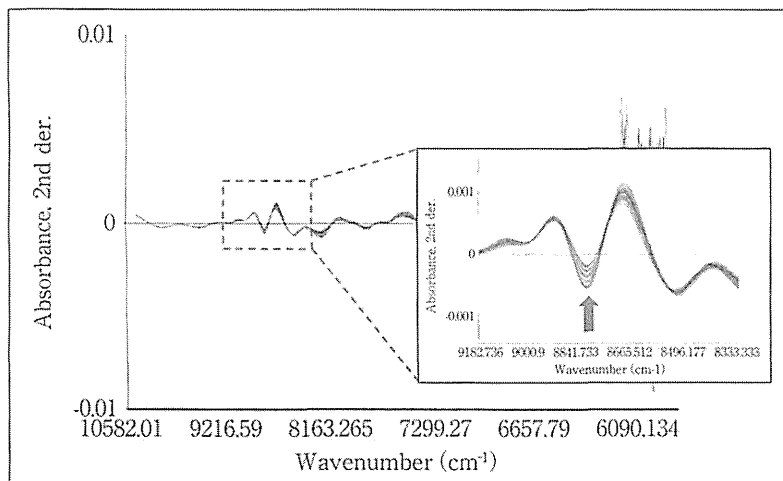


図6 アセトアミノフェン錠から得たNIR二次微分スペクトル
(含量 8w/w%~12w/w%, 5水準, 各水準n=6)

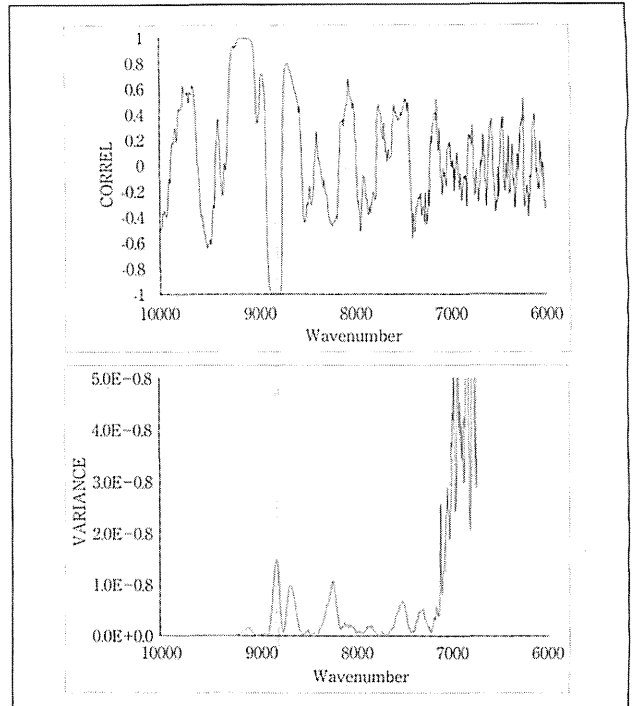


図7 アセトアミノフェンの濃度相関係数と分散プロット

いことがわかった。第二倍音領域の二次微分吸収を図6に示した。 $8,800\text{cm}^{-1}$ 付近に濃度依存的な吸収強度の変化が観察された。この領域の二次微分吸収(アセトアミノフェン濃度)の変化について、波数依存の相関係数と分散プロットを見ると、分散が最も大きく、かつ相関係数が最も高い吸収は $8,802\text{cm}^{-1}$ であった(図7)。このピーク位置はC-H第二倍音に帰属できる吸収であり、この吸収は他の構成成分と重ならないことから、アセトアミノフェンに特徴的な吸収を用いて定量分析を行うことが可能となった。さらに検量モデル構築用のモデル錠剤の処方において、主薬成分の濃度に対して他の構成成分が非共線であることも、相関係数-分散プロットの識別性を高めることに貢献しているものと考えている。直線性の評価の1つである相関係数においてHPLC法と比較して有意な差があるとはいえ、定量目標濃度の80~120%の狭い範囲を対象とする定量分析においては、吸光度-濃度相関における“非線形性”を考慮する必要性は低いものと考えられた。また、真度および併行精度においてもNIR法およびHPLC法間に有意な差は認められず、十分な定量性が得られるものと考えられた。

4. 議論および考察

本研究では、ICH Q2および日本薬局方等で提唱される分析法バリデーションに準じた分析能パラメータの評価を行った。特に臭化カリウムなどの塩はNIR領域に吸収をもたないため、妨害吸収なく目的含量の主薬成分に由来する吸収を得ることができる。これにより得たスペクトルを基準スペクトルとすることで真度の評価を行うことも可能であった。また、多変量解析による検量モデル構築においても、あらかじめ主薬成分のNIR吸収を帰属することは重要であり、これにより多変量解析を用いた場合でも、計算結果の妥当性について評価が可能となるものと考えられる。

近赤外領域のうち高波数側は、C-H、O-HおよびN-Hなどの基準振動の高次倍音(二次倍音、第三倍音など)が観察され、透過性が優れている。一般に定性・定量分析への適用では、比較的吸収が強い第一倍音領域が多いが、バンドの重なりが多く、特徴的な吸収を見出すことは比較的困難となることも多い。一方、倍音領域に関しては、高次の倍音ほど吸収は弱くなるが、非調和性の強い逆対称性伸縮振動のバンドが強くと現れ、対称性伸縮振動のバンドは現れないことが多い。この現象により、第二倍音領域のほうがバンドのオーバーラップが少なくなるために吸収が独立して検出され、特徴的なバンドを抽出できる可能性が高くなる。他方、高次倍音領域は一般的にエネルギーが弱いので、透過性は優れるものの定量分析に用いる際には低いS/N比が定量性に影響を与えることが懸念される。したがって、これまで分散NIR分光器では高次倍音領域においても良好なS/N比を得ることが可能となるが、フーリエ変換型分光器を用いた測定と比較して、1回あたりの測定に時間を要するため、In-line測定への導入には制限があった。本研究で用いたフォトダイオードアレイ方式の検出器を備えたポリクロメーター型分光器であれば、迅速かつ高感度に第二倍音領域の吸収を検出することが可能であり、今後、本領域の定量分析への適用が期待できることとなった。

まとめ

In-line測定では、Off-lineやAt-lineなどの測定と異なり、必ずしも錠剤が静止した状態や保持された状態ではない測定環境で得たデータを解析することが想定される。

このため、工程を模した環境で錠剤を静止して測定した透過光量を得ることは、動いている環境で得る分光データの妥当性を評価する際の重要な判断材料となるものと考えられる。例えば、動的環境下での光路長の変化と主薬含量のばらつき(または錠剤品質の不良)の識別などに対して、このような基礎分光情報は重要な情報を与える。さらには、GMP管理における逸脱管理上の判断材料となること、さらにはPATによるリリースが適切に運用可能であることを審査する際の有用な背景データにもなり得るものと考えている。

本研究では、1錠あたり約1秒で十分なS/N比とスペクトルの再現性が得られる透過測定が達成された。この結果は、将来的に短時間でより多くの錠剤の含量測定が可能となることを期待させるものであり、PATへの適用も含めた医薬品の品質評価ツールとしてのNIR分光法の適用可能性をさらに広げるものと考えられた。より迅速な透過測定を実現するための分析機器の改良や条件の設定、そして効率的なIn-line含量測定法の開発を今後の検討課題としたい。

NIR分光法の定量的アプローチについては、広く提唱されているケモメトリクスを第一選択的に適用する方法のほか、本研究で示したような単回帰による定量ア

PATの可能性を探る

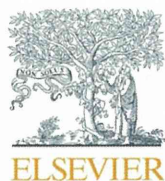
アプローチも適用可能であるものと思われる。分析者は、用いようとする分析条件、分析のタイプまたは分析法がもつ性能に応じて、適切な解析アプローチを選択することができる。可能な限りシンプルで理解しやすい定量アプローチが適用できればそれに越したことはない。大事なことは、用いようとする解析アプローチにおいて分析種から得られる科学シグナルと量の相関が良好であり定量的測定ができるということであり、さらには、その分析法の妥当性を客観的に示すことであろう。

謝辞

本研究の一部は厚生労働科学研究補助金研究(H23-医薬一般-010)および一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団「平成24年度 日本薬局方の試験法に関する研究」助成金において行ったものである。

参考文献

- 1) J. Luybaert, D.L. Massart, Y. Vander Heyden : *Talanta*, 72, 865-883(2007)
- 2) Y. Sulub, R. LoBrutto, R. Vivilecchia, B.W. Wabuyeel: *Anal. Chim. Acta.* 611, 143-150(2008)
- 3) A.T. Tok, X. Goh, W.K. Ng, R.B. Tan: *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 9, 1083-1091(2008)
- 4) T.R. De Beer, P. Vercruysse, A. Burqraeve, T. Quinten, J. Ouyang, X. Zhang, C. Vervaet, J.P. Remon, W.R. Baeyens: *J. Pharm. Sci.*, 98, 3430-3446(2009)
- 5) J. Mantanus, E. Ziémons, P. Lebrun, E. Rozet, R. Klinkenberq, B. Streel, B. Evrard, P. Hubert : *Anal. Chim. Acta.* 642, 186-192(2009)
- 6) M.J. Lee, C.R. Park, A.Y. Kim, B.S. Kwon, K.H. Banq, Y.S. Cho, M.Y. Jeong, G.J. Choi : *J. Pharm. Sci.*, 99, 325-335(2010)
- 7) T.R. De Beer, M. Wiqqenhorn, R. Veillon, C. Debacq, Y. Mayeresse, B. Moreau, A. Burqraeve, T. Quinten, W. Friess, G. Winter, C. Vervaet, J.P. Remon, W.R. Baeyens: *Anal. Chem.*, 81, 7639-7649(2009)
- 8) H. Wu, M.A. Khan : *J. Pharm. Sci.*, 9, 1516-1534(2010)
- 9) W. Li, L. Xing, L. Fang, J. Wang, H. Qu: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 53, 350-358(2010)
- 10) 尾崎幸洋：実用分光法シリーズ 近赤外分光法(アイビーシー、東京、1998)pp.18
- 11) K. Murayama, T. Genkawa, D. Ishikawa, M. Komiyama, Y. Ozaki : *Rev. Sci. Instrum.*, 84, 023104(2013)
- 12) A. Savitky, M.J.E. Golay, *Anal. Chem.*, 36, 1627-1639(1964)
- 13) J.H. Jiang, R.J. Berry, H.W. Siesler, Y. Ozaki, *Anal. Chem.*, 74, 3555-3565(2002)



Pharmaceutical evaluation of steroidal ointments by ATR-IR chemical imaging: Distribution of active and inactive pharmaceutical ingredients

Yoshihisa Yamamoto^a, Toshiro Fukami^{b,*}, Tatsuo Koide^c, Toyofumi Suzuki^b, Yukio Hiyama^c, Kazuo Tomono^b

^a Faculty of Pharmaceutical Science, Teikyo Heisei University, Japan

^b Laboratory of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Nihon University, Funabashi-shi, Chiba 274-8555, Japan

^c Division of Drugs, National Institute of Health Sciences, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2011

Accepted 7 January 2012

Available online 20 January 2012

Keywords:

Alclometasone dipropionate

Excipients

Formulation

Imaging analysis

Ointments

Semi-solids

ABSTRACT

We recently used micro attenuated total reflection infrared (ATR-IR) spectroscopy to conduct imaging analysis of ointments and evaluate the distributions of the active pharmaceutical ingredient (API) and excipients. An alclometasone dipropionate (ALC) ointment was used as a model product. Almeta[®], a brand-name product, had a domain with absorbance at 1656 cm^{-1} attributable to the carbonyl group of ALC, the API. Absorbances at 1040 and 3300 cm^{-1} were also noted in this domain, indicating the presence of the solubilizer, propylene glycol. Data also suggested the presence of benzyl alcohol in this domain. More detailed analysis showed the distribution of surfactants and other excipients in the base. Similar results were obtained for Vitra[®], a generic version of Almeta[®]. Imaging analysis with micro ATR-IR confirmed that both ointments are liquid droplet dispersions with ALC dissolved in propylene glycol and dispersed in a base. However, minor differences in the ingredient distributions of the two ointments were detected and reflect differences in excipient concentrations and type, or manufacturing differences. In summary, we used micro ATR-IR for imaging analysis of an original ointment, Almeta[®], and its generic form Vitra[®], and established a method for visually evaluating the distributions of the API and excipients in these ointments.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Microscopic imaging systems that employ X-ray fluorescence, infrared, near infrared, terahertz, Raman, and a variety of other spectroscopic techniques have recently become very useful analytical tools in the fields of pharmaceutical design and quality control. Microspectroscopic imaging systems consecutively determine the spectra of ultra-small pixels in a plane of the sample, analyze the spectral data, and produce images with the results combined to obtain a two-dimensional chemoinformatic image. When such a system is used to image the surface of a pharmaceutical tablet, for example, information previously unavailable by high-performance liquid chromatography (HPLC) and other analytical technologies, such as the distribution and blend uniformity of the active pharmaceutical ingredient (API) and excipients, is obtained. This information has been used to evaluate generic products and drug products purchased on the Internet (Veronin and

Youan, 2004; Westenberger et al., 2005). Many studies have been conducted to investigate the distribution and blend uniformity of the API and excipients in powders (Abhay et al., 2004; Bellamy et al., 2008; Li et al., 2008; Ma and Anderson, 2008; Shi et al., 2008).

The types and compositions of bases, and the techniques used to prepare ointments and other external preparations, significantly impact transdermal absorption of the drug (Stoughton, 1987; Jackson et al., 1989; Castanedo-Cazares et al., 2001; Curdy et al., 2004; Trottet et al., 2005). Using the above-mentioned microspectroscopic imaging systems to analyze ointment products would provide important information on the distribution of the API and excipients in these products. This type of information is currently available for tablets and powders. Spectroscopic evaluations of ointments often include infrared (IR) spectroscopy studies of drug release from ointment bases and the diffusion of drugs into artificial skin models (Wurstar et al., 1993; Hanh et al., 2000a,b,c; Remane et al., 2006; Guenther et al., 2008). However, we have been unable to identify any mention of the evaluation of an API or excipient distribution in an ointment using a microspectroscopic imaging system. We attribute this to the difficulty of imaging using near IR and IR diffuse reflectance, since diffuse reflectance is absent in liquid and semi-solid drug products (e.g., ointments).

* Corresponding author at: School of Pharmacy, Nihon University, 7-7-1 Narashinodai, Funabashi-shi, Chiba 274-8555, Japan. Tel.: +81 47 465 6699; fax: +81 47 465 6699.

E-mail address: fukami.toshiro@nihon-u.ac.jp (T. Fukami).

Table 1
Pharmaceutical ingredients used in the alclometasone ointments.

Pharmaceutical ingredients	Drug products	ALM	VIT
Base	White petrolatum	+	+
	White beeswax	+	+
	Liquid paraffin	+	+
Surfactant	Sorbitan esters of fatty acids	+	+
	Glycerol stearate	+	+
Solubilizing agent	Propylene glycol	+	+
	Benzyl alcohol	+	+
pH modulator	Phosphoric acid		+

Steroid ointments are used primarily as antiinflammatory preparations. Many original products and their generic versions are currently available on the market. Alclometasone dipropionate (ALC) ointments are classified as mild-type ointments with relatively mild pharmacological actions for steroid products. These ointments are widely used to treat atopic dermatitis in children (USP, 2011). It is thought, however, that long-term application to the affected skin surface could emphasize differences in the pharmacological characteristics of the original product and its generic versions. Procedures to pharmaceutically evaluate ALC ointments should therefore be established, but the concentration of the API in steroid ointments is generally low. The API in ALC ointments is generally between 0.05% and 0.1% (w/w). To address this difficulty, we conducted imaging with micro ATR-IR, which combines IR microscopy with attenuated total reflectance (ATR). ATR

analysis is more suited to spatial resolution than to measuring diffuse reflectance. IR analysis produces clearer spectra than near IR analysis, and the resulting spectra better facilitate the identification of a chemical structure (Andrew Chan et al., 2003). We conducted imaging analysis on the results and compared the distributions of the API and excipients in two ointment products. Finally, we evaluated the pharmaceutical characteristics of these ointments based on rheological characteristics, polarization microscopy findings, and analyses of the ingredients.

2. Experimental

2.1. Reagents

The ALC ointments Almeta[®] Ointment 0.1% (ALM), an original drug product by Shionogi & Co., Ltd. (Osaka, Japan), and Vitra[®] Ointment 0.1% (VIT), a generic version by Iwaki Seiyaku Co., Ltd. (Tokyo, Japan), were analyzed. The ALC used was a USP reference standard, and all other reagents used were reagent-grade chemicals by Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan).

2.2. Polarization microscopy

The microscopic features of the ointments were characterized by applying a small amount of the sample to a microscope slide, covering with a cover slip, and observing under an E-600-Pol polarizing

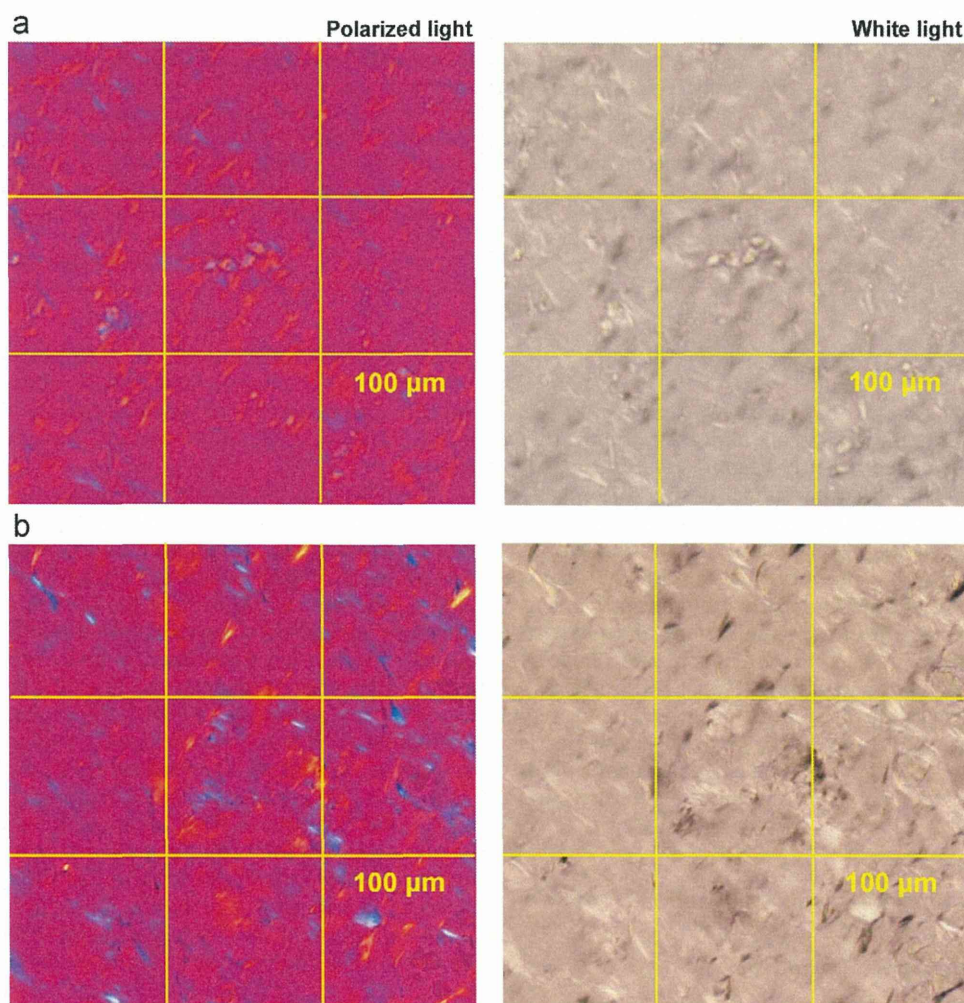


Fig. 1. Microscopic images of ALC ointments for (a) ALM and (b) VIT; magnification: 200 \times .

microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) in reflection mode at 200× magnification.

2.3. Determination of standard IR spectra

The pharmaceutical ingredients of ALM and VIT are shown in Table 1. The IR spectrum of each ingredient was determined with an FT/IR-4100 (JASCO Inc., Tokyo, Japan) equipped with an ATR unit (Dura-samplIR II, Smiths Detection Group Ltd., Watford, UK) at a wavenumber resolution of 4 cm⁻¹ with 16 scans across the wavelength range of 4000–650 cm⁻¹.

2.4. Determining and imaging micro IR spectra

Spotlight400 (Perkin Elmer Japan, Yokohama, Japan), a line chemical imaging system equipped with a MCT linear array detector and Ge ATR accessory, was used to collect the IR spectra of ointments. Each spectrum came from a 1.56 μm × 1.56 μm square pixel. The background was measured in air, and the sample scans were recorded at 8 cm⁻¹ spectral resolution with 2 scans across the range of 4000–750 cm⁻¹. Data were analyzed using Irys chemical imaging software (version 5.0, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). The absorbance data of the IR spectra were subtracted by the absorbance at 1688 cm⁻¹ to remove the baseline effect. The offset data from the ointments were used to generate chemical images using a peak height method based on the characteristic peaks of the pure components.

2.5. Determination of rheological characteristics

A spread meter (Rigo Co., Ltd., Tokyo, Japan) was used to evaluate ointment spread. The diameter D of a 0.5 (cm³) sample of ointment was visually measured after 5–200 s. The yield value S_0 (dyne/cm²) was calculated using the formula of Ichikawa (1977) using D_∞ (cm) at 200 s, the final measurement point (Scheme 1).

In the formula, G is gravitational acceleration (980 cm/s²), P is the glass plate mass (g), and V is the volume of the sample (cm³). A schematic diagram and photograph of the equipment used is provided in the supporting information (Fig. S1).

$$S_0 = \frac{48PVG}{\pi^2 D_\infty^5} \dots (1)$$

Scheme 1.

2.6. Determining the content of propylene glycol (PG) and benzyl alcohol (BA) in the ointment

First, approximately 100 mg of the ointment was dispersed in 3 mL of hexane. Then, 5 mL of acetonitrile was added, and the resulting mixture was shaken for 10 min. One milliliter of the acetonitrile bottom layer was collected and diluted with acetonitrile to a volume of 20 mL. The resulting liquid was analyzed using a HP 6890 gas chromatograph (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) equipped with a JMS-AM II15 mass spectrometer (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). GC/MS was conducted according to the following conditions:

GC condition; column: HP-INNOWAX polar capillary column (30 m × 0.32 mm i.d. × 0.25 μm film thickness, cross-linked polyethylene glycol), column temperature: 60 °C (2 min) → (15 °C/min) → 240 °C (6 min), injection temperature: 220 °C, injection mode: splitless, gas flow rate: 1.0 mL/min (He, constant flow).

MS condition; electric ionization (70 eV, 300 μA), interface temperature: 240 °C, ion source temperature: 200 °C.

3. Results and discussion

ALM, the original ALC ointment product, contains the API dissolved in an almost saturated state in propylene glycol (PG) and other solubilizers. In the interview form (Shionogi & Co., Ltd., 2011) of ALM, special technology is reportedly used to disperse this as microscopic droplets into a petroleum jelly base to form a liquid droplet dispersion. ALM and VIT (Iwaki Seiyaku, 2008), a generic version, contain multiple excipients (Table 1) and are thus appropriate drug products for evaluating API and excipient distribution. We began by microscopically observing these ALC ointments and conducting IR analyses of their ingredients. Then, the microscopic

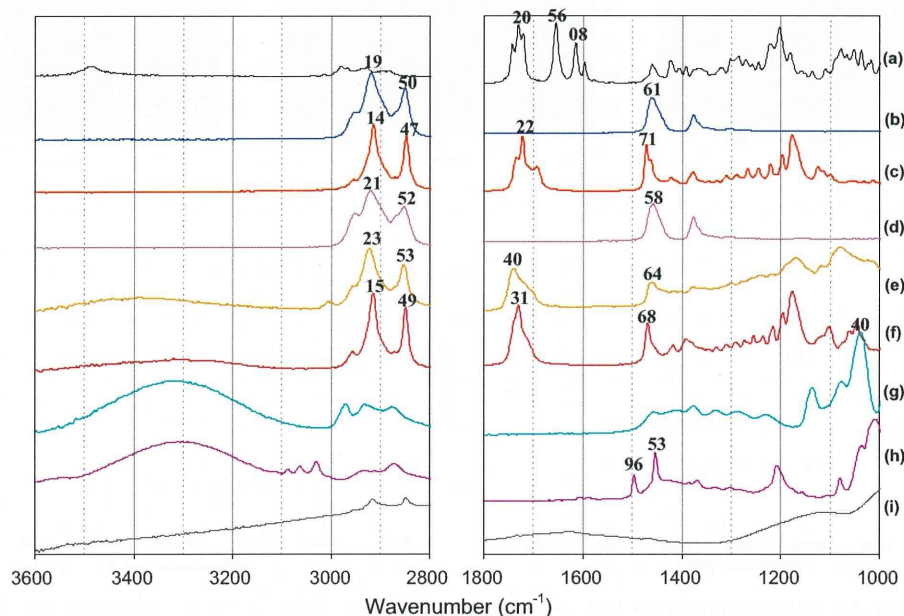


Fig. 2. IR spectra for pharmaceutical ingredients used in the ALC ointments; (a) ALC, (b) white petrolatum, (c) white beeswax, (d) liquid paraffin, (e) sorbitan esters of fatty acid (sorbitan monooleate), (f) glycerol stearate (glycerol monostearate), (g) propylene glycol, (h) benzyl alcohol and (i) phosphoric acid.

structures of these ointment products, as characterized by IR imaging, were investigated.

3.1. Evaluation of basic pharmaceutical characteristics

Fig. 1 shows the results of polarization microscopy of the ALC ointment products. Neither of the two ALC ointment products investigated exhibited a distinct droplet structure. Refractive light attributable to the partial crystalline structure of white petrolatum, the base, was evident. The lack of any crystals of ALC, the API, in the overall samples outside the fields shown in Fig. 1 suggests that the ALC in each ointment product is either dissolved in the base or dispersed as microparticles so small as to be not visually apparent. In either case, it is difficult if not impossible to distinguish ALM, the original product, from VIT, the generic version, based on these images.

Reference IR spectra of the API and major excipients (Table 1) of the two ointment products are shown in Fig. 2. Peaks near 1608, 1656, and 1720 cm^{-1} in the IR spectrum of ALC are attributable to ester and ketone groups. White petrolatum (WP) and liquid paraffin (LP), which form the base of the ointments, exhibit multiple peaks around 1461, 2850, and 2919 cm^{-1} that are indicative of C–H bending vibrations and stretching vibrations, respectively. The base white beeswax (WB, found only in VIT), the surfactant glyceryl monostearate (found only in VIT as glyceryl stearate (GS)), and sorbitan monooleate (found only in ALM as sorbitan esters of fatty acids (SE)), each displayed a single peak near 1720 cm^{-1} . The solubilizers propylene glycol (PG) and benzyl alcohol (BA), which serve as a solubilizer as well as a preservative, showed a broad peak around 3300 cm^{-1} and a sharp peak near 1040 cm^{-1} . A distinctive peak due to BA was observed near 1496 cm^{-1} .

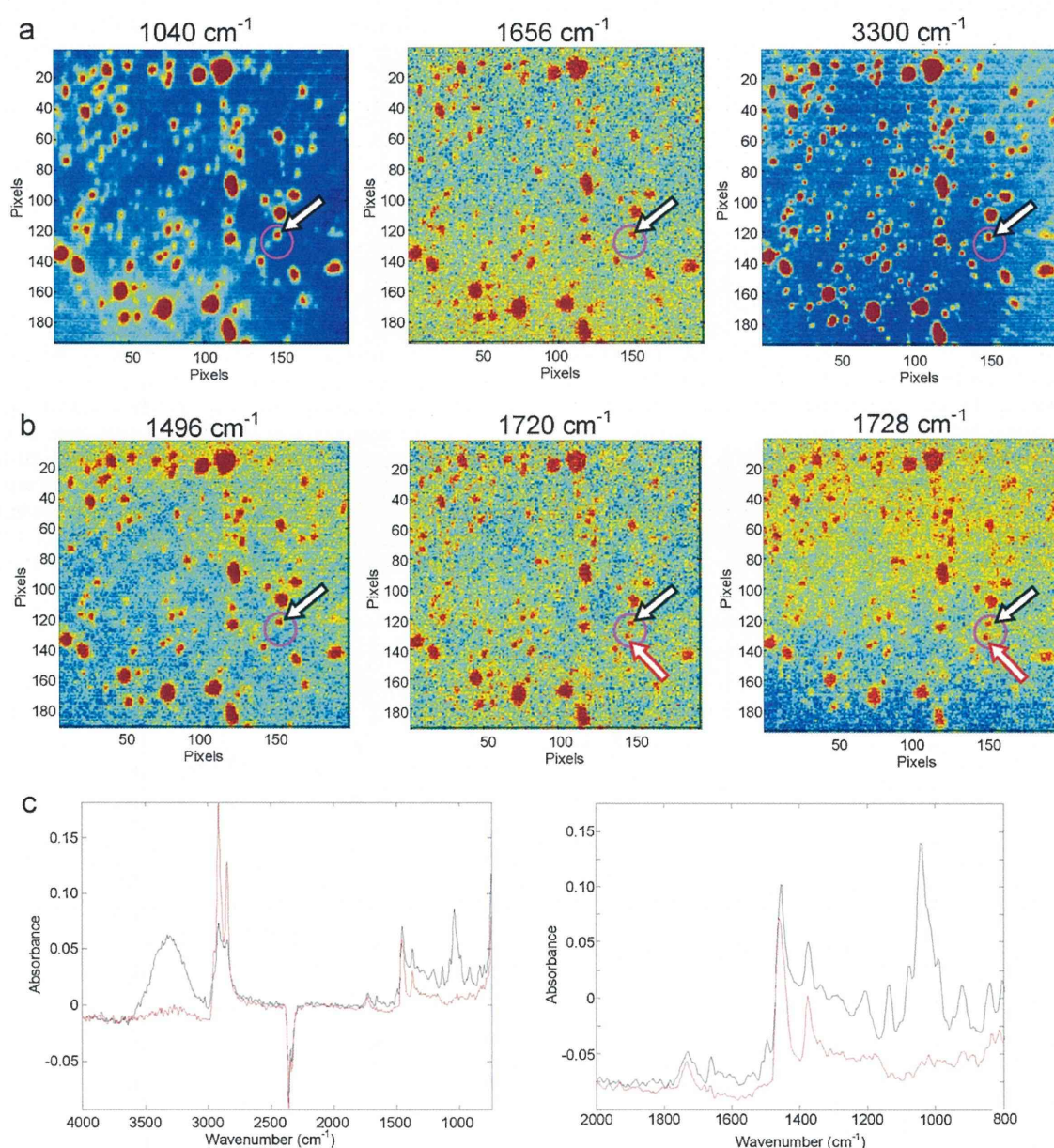


Fig. 3. (a) ATR imaging in the mid-IR of ALM ointments at 1040, 1656, and 3300 cm^{-1} and (b) 1496, 1720 and 1728 cm^{-1} , respectively. Red indicates high density and blue indicates low density. Units on the x and y axes are number of pixels. One pixel corresponds to $1.56 \mu\text{m}^2$. (c) IR spectra obtained from the domains indicated by red (red spectra) and black arrow (black spectra) in the ATR imaging. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

3.2. Micro ATR-IR imaging

3.2.1. Imaging of ALM and VIT

Micro ATR-IR spectral imaging analysis (Figs. 3 and 4) at the wave numbers believed to be specific to each ingredient was conducted in reference to the reference IR spectra of the ointment ingredients (Fig. 2). The IR spectra shown by black lines in Figs. 3c and 4c were obtained from the domains indicated with black arrows in these figures. These spectra were compared with the reference spectra (Fig. 2). The presence of a broad peak near 3300 cm^{-1} and a sharp peak near 1040 cm^{-1} suggests the presence of PG. The presence of peaks near 2900 and 1400 cm^{-1} is indicative of the hydrocarbons WP and LP. Finally, the peak near 1656 cm^{-1} is attributable to the ester and ketone groups of the API, ALC. Figs. 3a and 4a show the distribution of the domains with absorbances at 1040 cm^{-1} and 3300 cm^{-1} (PG) as well as 1656 cm^{-1} (ALC) in the images obtained from the imaging analysis of ALM and VIT with micro ATR-IR. This domain with absorbances at the 1040 , 1656 and 3300 cm^{-1} suggests that ALC is dissolved in PG and distributed as droplets in the base.

3.2.2. Surfactant distribution in the two ointment products

As ALC shows absorbance not only at 1656 cm^{-1} but also near 1720 cm^{-1} (Fig. 1), the domains of the images at 1656 , 1720 , and 1728 cm^{-1} in the ATR-IR images of ALM and VIT were expected to overlap. Analysis, however, revealed many domains with absorbance only at 1728 cm^{-1} in VIT (e.g., the domain indicated by the red arrow in Fig. 4b). Such domains were also observed for ALM, albeit only slightly (Fig. 3b). Images at the three wave numbers 1040 , 1656 , and 1728 cm^{-1} were superimposed (Fig. 5). The superimposed image shows that most of the domains observed for ALM are on top of one another (the domains shown in white to yellow in the figure). In contrast, for VIT, although some of the domains were duplicated, many appeared as dispersed. This shows that ALC and PG are distributed together in ALM while in VIT, multiple ingredients are independently dispersed. This finding is indicative of differences in the formulations and manufacturing processes of the two products.

The source of the many independently observed domains at 1728 cm^{-1} in VIT (shown in blue in Fig. 5b) appears to be the surfactant or WB, judging from a comparison to the reference spectra

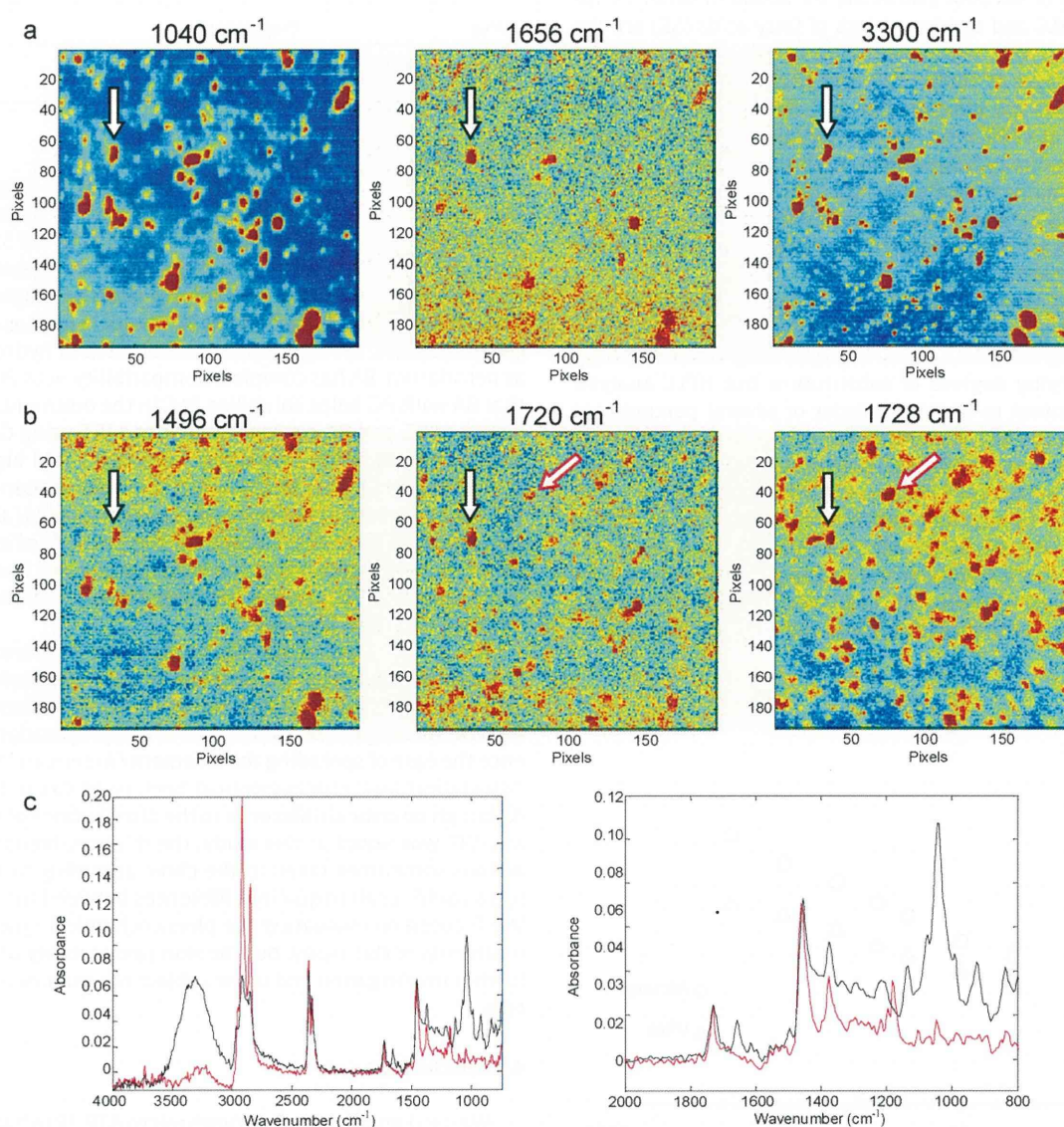


Fig. 4. (a) ATR imaging in the mid-IR of VIT ointments at 1040 , 1656 , 3300 cm^{-1} and (b) 1496 , 1720 and 1728 cm^{-1} , respectively. Red indicates high density and blue indicates low density. Units on the x and y axes are number of pixels. One pixel corresponds to $1.56\text{ }\mu\text{m}^2$. (c) IR spectra obtained from the domains indicated by red arrow (red spectra) and black arrow (black spectra) in the ATR imaging. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

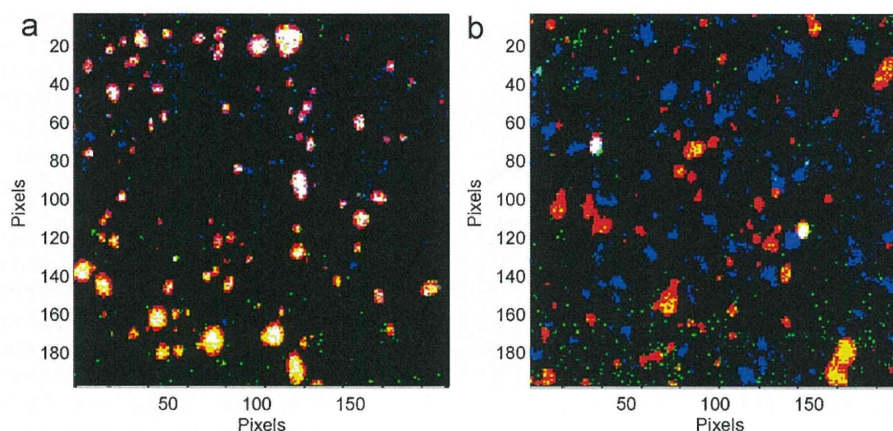


Fig. 5. Overlapped ATR imaging indicating a speculated distribution of pharmaceutical ingredients in ointment; (a) ALM and (b) VIT. Red, green and blue region indicates the domains where absorption is observed at 1040, 1656 and 1728 cm^{-1} , respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

(Fig. 2). Thus, the images at 1720 and 1728 cm^{-1} may indicate the presence not only of ALC, but also of the surfactant or other excipients. However, ALC and sorbitan esters of fatty acids (SE) are the only ingredients in ALM with absorbance in this area (Fig. 2 and Table 1). In the images at 1656, 1720, and 1728 cm^{-1} , the domains in which all repeats are indicative of ALC, and the domains with absorbances only at 1720 and 1728 cm^{-1} are indicative of the presence of SE. The spectra indicated with black and red lines in Fig. 3c (IR spectra of domains indicated by the black and red arrows in Fig. 3, respectively) show a distinct difference between the two domains. The peak attributable to ALC near 1656 cm^{-1} in the former is absent from the latter.

SE and glyceryl stearate (GS), which are included in ALM and VIT as surfactants, are difficult to accurately quantitatively determine because they are mixtures of multiple fatty acids and fatty acid esters of varying degrees of substitution, but HPLC analysis suggests their content to be on the order of several percent (see Supp. inf., Figs. S2 and S3). The evaluation of rheological characteristics using a spread meter indicated both ointments to have plastic fluidity. The yield values for ALM and VIT, which are 1621.2 ± 75.4 and 2986.0 ± 508.1 (dyne/cm²), respectively, show VIT to be the harder ointment (Fig. 6). Since WB is a solid at room temperature, its inclusion in a formulation is expected to result in a harder ointment. The many domains at 1728 cm^{-1} in the VIT images (Fig. 5b) thus suggest the presence of WB and GS in relatively large amounts.

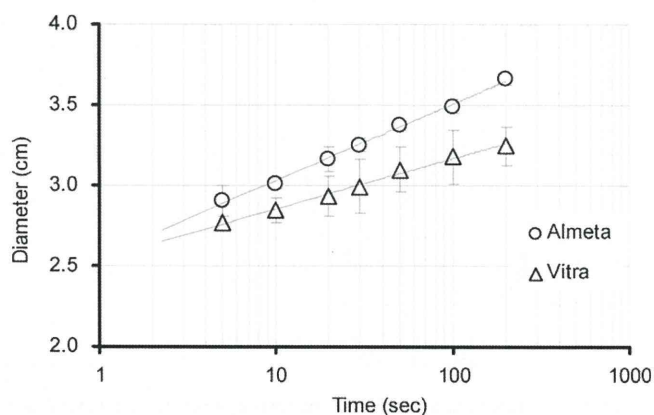


Fig. 6. Changes in sample diameter of ALC ointments in spread meter.

Table 2

Propylene glycol and benzyl alcohol content of alclometasone ointments.

Drug	Propylene glycol	Benzyl alcohol
ALM	1.1 ± 0.1	1.9 ± 0.0
VIT	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0

3.2.3. Distribution and determination of PG and BA

Detailed investigation of the ALM and VIT images lead to the identification of small peaks near 1496 cm^{-1} in spectra obtained from domains with absorbances at 1040, 1720, and 3300 cm^{-1} (see Supp. inf., Fig. S4). Only BA shows the presence of absorbance peaks at this wavenumber (Fig. 2), showing that the droplets are constituted of BA and PG. The excipient BA is widely used as a preservative (Iwaki Seiyaku, 2008) but does not dissolve in hydrocarbons such as petrolatum. BA has complete compatibility with PG, so it follows that BA with PG helps solubilize ALC in the ointment. The determination of PG and BA content in ALM and VIT using GC/MS showed the PG content in VIT to be approximately 3-fold higher than that in ALM (Table 2). Data on the total PG and BA content indicate that VIT has about twice the solubilizer content as ALM (although BA do not appear to have been added for the purpose of solubilization). As mentioned above, VIT is the harder ointment. The use of WB as an excipient in VIT, despite the large solvent volumes, appears to increase ointment hardness.

The permeation of the API in external preparations through the skin is affected by the amount of the API dissolved in PG and other ointment ingredients (Ishii et al., 2005; Remane et al., 2006) and the rheological characteristics of the preparation, which influence the ease of spreading the ointment (American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Society of Great Britain, 1986). Although no critical difference in the distributions of the API in ALM and VIT was noted in this study, the dilution, blending, and other actions sometimes taken in the clinic according to patient symptoms could result in quality differences between the two products. We focused on evaluating the physicochemical quality of the two ointments in this study, but the skin permeability of ALC warrants further investigation and is the subject of a manuscript in preparation.

4. Conclusions

We used imaging analysis with micro ATR-IR to evaluate ALM, an original 0.1% ALC ointment, and VIT, a generic version. Differences in the distributions of the API and excipients were identified. ALC, dissolved in PG and BA, was found to be dispersed in the petrolatum

base. Differences in the degree of dissolution of the API and its concentration in droplets, as well as the dispersion of these droplets, may lead to differences in API permeation in the microstructures of the skin (Fig. S5). Consequently, pharmaceutical evaluation of original products and their generic versions could provide information to facilitate appropriate use. Imaging technology with micro ATR-IR has been previously used to evaluate tablet and powder product quality, but we believe our study to be the first of its kind on ointment products. Findings obtained from this study are therefore significant not only for their visual evaluation of the distribution of the API and excipients in ointments, but also for the contribution made to scientific progress.

Acknowledgements

This work was supported in part by a grant from the “High-Tech Research Center” Project for Private Universities, matching fund subsidy from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT) 2007–2011 of Japan (to T.S.), and a Grant-in-Aid for Scientific Research (20366628 to T.F.). The authors thank Dr. Koichi Metori and Ms. Megumi Nakajima for their technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijpharm.2012.01.017.

References

- Abhay, G., Garnet, E.P., Ronald, W.M., Kenneth, R.M., 2004. Nondestructive measurements of the compact strength and the particle-size distribution after milling of roller compacted powders by near-infrared spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* 93, 1047–1053.
- American Pharmaceutical Association, Washington D.C., USA and Pharmaceutical Society of Great Britain, London, England, 1986. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*.
- Andrew Chan, K.L., Hammond, S.V., Kazarian, S.G., 2003. Applications of attenuated total reflection infrared spectroscopic imaging to pharmaceutical formulations. *Anal. Chem.* 75, 2140–2146.
- Bellamy, L.J., Nordon, A., Littlejohn, D., 2008. Effects of particle size and cohesive properties on mixing studied by non-contact NIR. *Int. J. Pharm.* 361, 87–91.
- Castanedo-Cazares, J.P., Quistian-Galvan, J., Torres-Alvarez, B., Torres-Ruvalcaba, A., Moncada, B., 2001. Antiinflammatory effect of topical corticosteroid: known brand versus generic drug. *Gac. Med. Mex.* 137, 624–625.
- Curdy, C., Nalik, A., Kalia, Y.N., Alberti, I., Guy, R.H., 2004. Non-invasive assessment of the effect of formulation excipients on stratum corneum barrier function in vivo. *Int. J. Pharm.* 271, 251–256.
- Guenther, U., Smimova, I., Neubert, R.H., 2008. Hydrophilic silica aerogels as dermal drug delivery systems—dithranol as a model drug. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 935–945.
- Hanh, B.D., Neubert, R.H., Wartewig, S., 2000a. Investigation of drug release from suspension using FTIR-ATR technique: part I. Determination of effective diffusion coefficient of drugs. *Int. J. Pharm.* 204, 145–150.
- Hanh, B.D., Neubert, R.H., Wartewig, S., 2000b. Investigation of drug release from suspension using FTIR-ATR technique: part II. Determination of dissolution coefficient of drugs. *Int. J. Pharm.* 204, 151–158.
- Hanh, B.D., Neubert, R.H., Wartewig, S., Christ, A., Hentzsch, C., 2000c. Drug penetration as studied by noninvasive method: Fourier transform infrared-attenuated total reflection, fourier transform infrared, and ultraviolet photoacoustic spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* 89, 1106–1113.
- Ichikawa, I., 1977. *Wakariyasui Kami Inki Insatsu No Kagaku*. Insatsu Choyokai Foundation, Tokyo, pp. 133–135.
- Ishii, H., Todo, H., Sugibayashi, K., 2005. Effect of sebum and ointment rubbing on the skin permeation of triamcinolone acetonide from white petrolatum ointment. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 876–880.
- Iwaki Seiyaku Co., Ltd., 2008. *Vitra Ointment 0.1% Interview Form*, Ver. 3.
- Jackson, D.B., Thompson, C., McCormack, J.R., Guin, J.D., 1989. Bioequivalence (bioavailability) of generic topical corticosteroids. *J. Am. Acad. Dermatol.* 20, 791–796.
- Li, W., Woldu, A., Kelly, R., McCool, J., Bruce, R., Rasmussen, H., Cunningham, J., Winstead, D., 2008. Measurement of drug agglomerates in powder blending simulation samples by near infrared chemical imaging. *Int. J. Pharm.* 350, 369–373.
- Ma, H., Anderson, C.A., 2008. Characterization of pharmaceutical powder blends by NIR chemical imaging. *J. Pharm. Sci.* 97, 3305–3320.
- Remane, Y., Leopold, C.S., Maibach, H.I., 2006. Percutaneous penetration of methyl nicotinate from ointments using the laser Doppler technique: bioequivalence and enhancer effects. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 33, 719–735.
- Shi, Z., Cogdill, R.P., Short, S.M., Anderson, C.A., 2008. Process characterization of powder blending by near-infrared spectroscopy: blend end-points and beyond. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47, 738–745.
- Shionogi Co., Ltd., 2011. *Almeta® Interview Form*, Ver. 11.
- Stoughton, R.B., 1987. Are generic formulations equivalent to trade name topical glucocorticoids? *Arch. Dermatol.* 123, 1312–1314.
- Trottet, L., Owen, H., Holme, P., Heylings, J., Collin, I.P., Breen, A.P., Siyad, M.N., Nandra, R.S., Davis, A.F., 2005. Are all acyclovir cream formulations bioequivalent? *Int. J. Pharm.* 304, 63–71.
- USP, 2011. *United States Pharmacopeia. 34-National Formulary 29, Official monographs, Alclometasone dipropionate ointment*. Rockwell, MD, USA, pp. 1777–1778.
- Veronin, M.A., Youan, B.B., 2004. *Magic bullet gone astray: medications and the internet*. *Science* 305, 481.
- Westenberger, B.J., Ellison, C.D., Fussner, A.S., Jenney, S., Kolinski, R.E., Lipe, T.G., Lyon, R.C., Moore, T.W., Revelle, L.K., Smith, A.P., Spencer, J.A., Story, K.D., Toler, D.Y., Wokovich, A.M., Buhse, L.F., 2005. Quality assessment of internet pharmaceutical products using traditional and non-traditional analytical techniques. *Int. J. Pharm.* 306, 56–70.
- Wurstar, D.E., Buraphacheep, V., Patel, J.M., 1993. The determination of diffusion coefficients in semisolids by fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Pharm. Res.* 10, 616–620.

