

成分の圧密度の傾向を調べることができる。さらに全身適用経皮吸収 (TDDS) 製剤²⁰⁾ など特殊な処方をもつ製剤などにおいて基剤中に含まれる結晶性成分の検知などへの応用も可能である。これは有機材料への高浸透性と時間分解から得られる物理的情報を用いたものであるが、コーティングなどの品質評価やコーティング工程管理への適用においては有用な情報をもたらすものと期待される。

図4にフィルムコーティングが施された複数の市販錠剤の THz パルスイメージを示した。この図は4つの市販製剤について、錠剤表面からの THz 反射強度 (各錠剤左側) 及び深さ0.26mm における錠剤横断面からの THz 反射強度の分布を示している。THz 波が医薬品成分の内部深くに浸透する性質を利用した時間領域分光により、非破壊で錠剤内部の物理情報を可視的に観察することも可能である²¹⁾。装置によっては3D イメージングを得ることもできる。これらの情報と品質への相関はまだ検討の余地があるが、工程依存的な THz イメージが得られることが分かっており、工程品質が恒常的に維持されていること、ならば

に市場流通品の品質確保 (偽造医薬品の検知など) にも応用可能である。In-line 測定など、PAT ツールとしての実用化に関しては、まだ多くの検討課題があるものの、コーティング品質の解析・評価などへの応用が期待されている。

一方、遠赤外/テラヘルツ帯電磁波で得られる分子スペクトルでは、主として骨格振動や分子間 (内) 水素結合などに由来する振動分光情報を与える。特に結晶性化合物においては、結晶フォノン振動がこの電磁波領域に発現することから、結晶多形転移や水和等の擬似結晶形転移を鋭敏に検知することができる。製薬分野においては、主としてこれらの結晶形に関する情報を得ることが期待されている。例として、テオフィリンにおける擬似結晶形と THz スペクトルについて図5に示す。医薬品の主薬成分として用いられるテオフィリンの無水物が水分存在下において水和物となった後、加熱乾燥工程において無水物へ再転移すること、また真空乾燥工程において非晶質に転移することが THz スペクトルにより確認できる。結晶フォノン振動を検知するために (擬似) 結晶形転移によってスペクトルが大きく変化するが、非

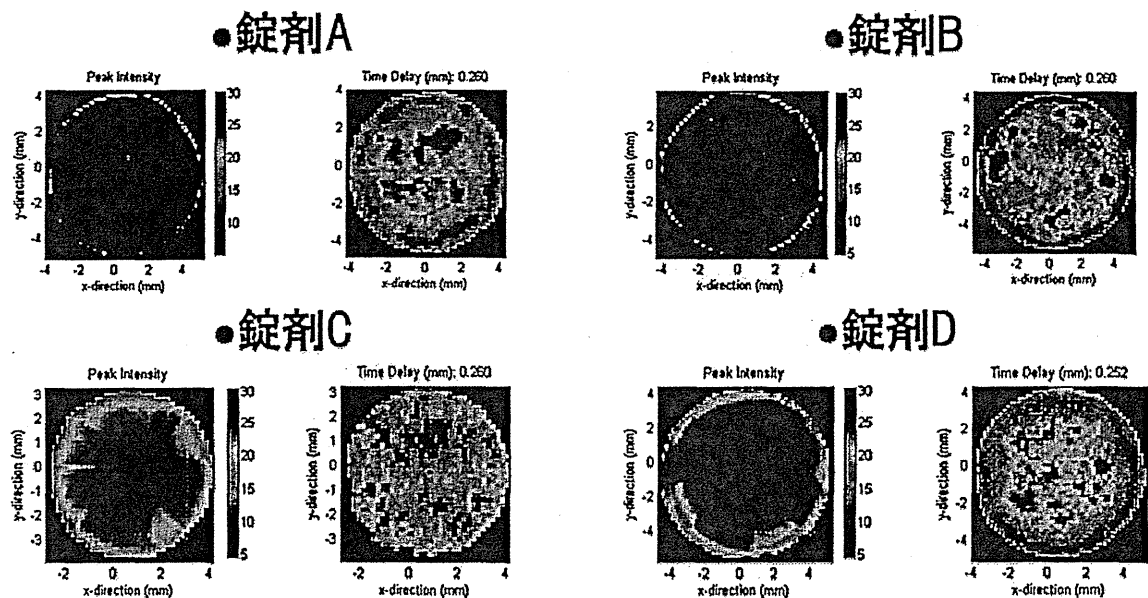


図4 4種類の市販フィルムコート錠の THz イメージ
(左側：表面部分，右側：表面から0.26mmの平面における屈折率変化の分布)

晶質化が進行する場合には、一般的に吸収はブロードとなり、やがて消失する。このように、結晶形の変化について鋭敏に検知できることがテラヘルツ分光計測の利点として挙げられる。

テラヘルツ帯の電磁波は生体に対して安全であるとされ、これらの利点は、工程中の結晶形管理など、試験（作業）者の安全性に留意したPATツールの導入が可能となると期待されている。

4. ラマン分光法による製造管理と薬局方

ラマン分光法は赤外（IR）分光法と同じく、光を照射することによって生じる分子振動等のエネルギー変化を測定しており、化合物の構造に応じて特有のピークシフトを生じることから化合物の同定や結晶多形の判別、定量などに用いる。すなわち、ある一定の波長の光（レーザー光）を化合物に照射すると照射光の散乱（レイリー散乱）とは異なる波長の散乱光（ストークス及びアンチストークス散乱）が発生するが、これを分光して得たスペクトルを分析に利用する手法がラマン分光法である。但しIR分光法とは検出しやすい化学構造が異なり（IRは例えばC-H結合がよく見えるが、ラマンはC-C結合などが得意である）、

それゆえラマン分光法とIR分光法は互いに補完的な方法とも言える。一般的には照射する光の波長は532や785nmが用いられるが、最近ではレーザーを照射した際に発生する蛍光の影響を避けるために1000nm以上の光も用いられるようになってきている。

PATとしては現在、NIR分光法が最も実用化が進んでいるが、温度、湿度などの外部環境や粒子径など原料の物性に測定結果が大きく影響される。そのため、製造現場において実際にリアルタイムモニタリングに用いるには、先に述べたように検量線のキャリブレーション、バリデーションや再バリデーションなどのメンテナンスに手間がかかる。またNIR分光法による測定が不可能な化合物もある。そこでこれらの影響を受けにくいラマン分光法をPATへ応用することが検討されている。特に最近では前方散乱型（透過型）ラマン²²⁾や超低波数、アンチストークス領域のスペクトルを利用した²³⁾新しいラマン分光技術の開発、導入の検討が積極的に行なわれている。ラマン分光法はこれまで後方散乱型（反射型）が主であったが、前方散乱型ラマン分光法を導入することにより、製剤の表面だけでなく広範囲が測定できる

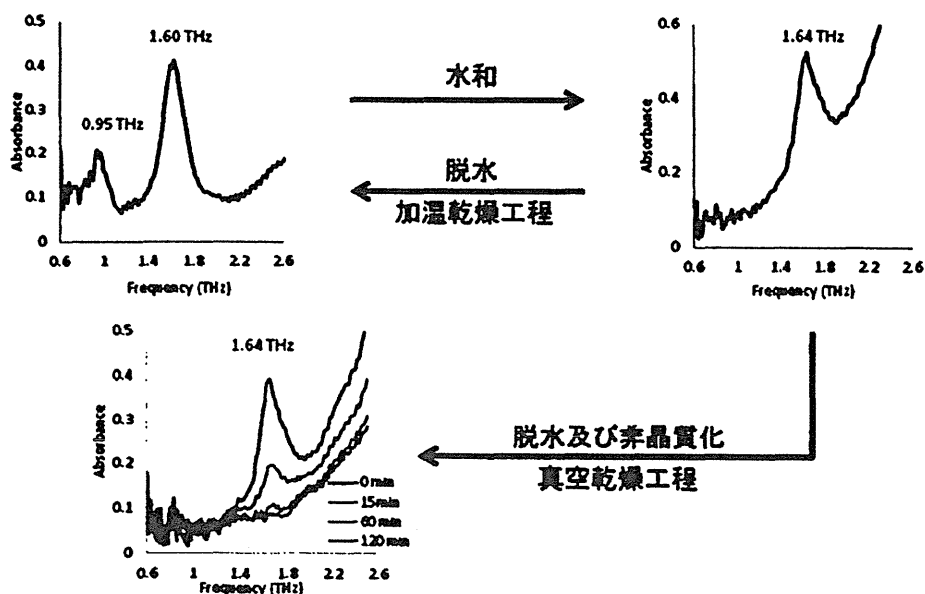


図5 テオフィリンの水和・脱水及び非晶質化に基づくTHzスペクトルの変化

よくなることから、精度良く解析、定量できるようになった。さらに検量線のメンテナンスが不要になる等、NIRより解析が簡素化できる。また、超低波数、アンチストークス領域のスペクトルを利用すれば蛍光の妨害が少なくなり、より多くの化学情報が得られる等の利点がある。

一方、薬局方における医薬品原料の確認試験ではIR分光法が使われることが多いが、測定時にはKBr、パラフィン等による希釈など前処理を必要とする場合がほとんどである。そのため、KBr法などの前処理中に塩交換を起こす等によりスペクトルが変化するなどの欠点があるが、最近の医薬品には結晶多形を持つ化合物が増加する傾向にあり、通常のIRスペクトルによる判別が難しいケースも増えている。近年、携帯型ラマン分光器を用いた医薬品原料の受入のための確認試験²⁴⁾が行われているが、これはラマン分光法ではIR分光法とは異なり、KBrなどによるサンプル前処理が不要で、測定が非破壊、迅速であるため、前処理中に化合物が変化を起こすことなく結晶多形が識別可能なためである(図6)。現在、日本ではPIC/Sへの加盟申請が行われる中、国際的に受け入れられる医薬品品質管理システムの確立が必要とされる。GMPが十分機能していな

い国からの医薬品原材料の受入れ試験(確認試験)は、欧州では既にロット毎ではなく、小分けされた容器毎に実施している。先に述べたようにIR分光法の場合は前処理を必要とする場合がほとんどであり、このような容器ごとの全数試験には不向きである。こういった情勢を背景に、最近ではラマン分光法を医薬品原料の受入時の確認試験として導入する企業が増えてきている。

多くの利点があるラマン分光法ではあるが、現状はUSPやEPには既に記載されているが、日局にはまだ記載されておらず、そのため日本ではラマン分光法を用いた規格試験を採用するケースは少ない。また、錠剤によく使われる乳糖など、蛍光の影響でベースラインシフトを起こす化合物も多いため、製剤の測定、解析には注意が必要である。また照射レーザーのエネルギーが比較的高く、場合によっては試料が焦げることもある等の欠点もある。しかしこれらは改善の方向にあり、ラマン分光法は次世代のPATの実用化技術として有望視されている。

5. 製剤のケミカルイメージング

近年の医薬品品質管理法を変革するひとつのきっかけとなったICH Q8のQbDアプローチを

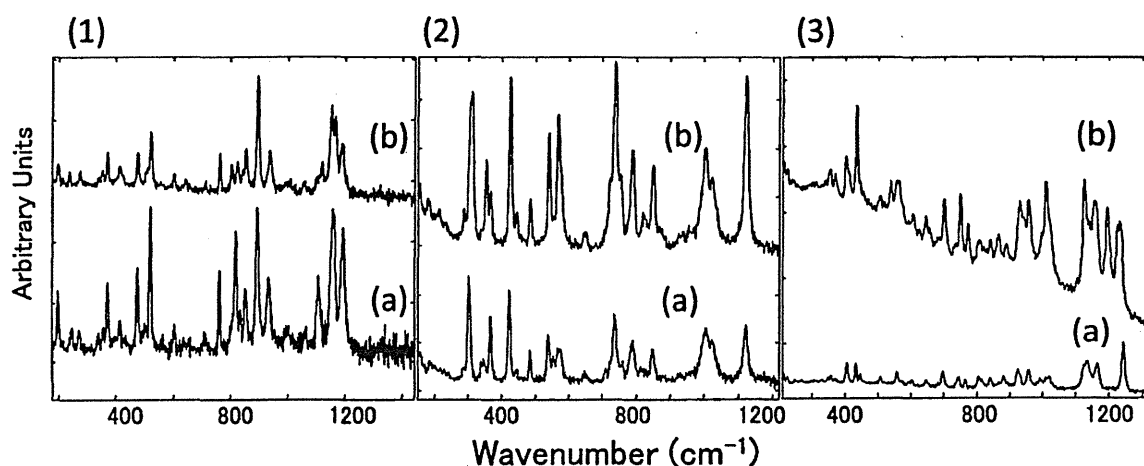


図6 結晶多形のラマンスペクトル

- | | | |
|---------------|----------------|----------------|
| (1) アセトアミノフェン | (a) 1形 | (b) 2形 |
| (2) プロブコール | (a) 1形 | (b) 2形 |
| (3) インドメタシン | (a) γ 形 | (b) α 形 |

基にした理想の製剤開発及び品質管理とは、品質を製品試験や製造工程のバリデーションだけで保証するのではなく、製造工程を理解し、それを基に目的の品質の製品が製造されるように設計を行い、製造工程を適切にコントロールし「品質を製品中に造り込む」ことによって製品の品質を保証することである。そのため製造工程を理解することは特に重要であり、それに対応する分析評価技術が必要となる。ケミカルイメージングとは、測定対象試料の平面において微少な区画 (Pixel) ごとにスペクトルを順次測定し、得られた大量のスペクトルデータを解析、位置情報と組み合わせることでイメージング=画像化する技術であり、化学のデジタルカメラといえる手法である。現在のところ赤外、近赤外、テラヘルツやラマンなど様々な分光技術を用いた顕微分光イメージングシステム²⁵⁾や特性X線、TOF-SIMS²⁶⁾などが利用されているが、用いる手法により得られる情報が異なるため、一つの手法だけでなく他のケミカルイメージング技術と複合的に用いるという手法も用いられている。

医薬品錠剤の表面をケミカルイメージングシステムにより画像化した場合、目では見えない化学的な情報が視覚化され (図4)、これまでHPLCなどの分析技術では測定できなかった錠剤中の主薬や添加剤の分布、混合状態などの情報が得られることになり、製造中で何が起こったのかを明確に示すために、工程理解に最適なツールである。そのためケミカルイメージング技術は製造工程の不具合の原因説明にもよく使われており、流動性が悪くなり工程トラブルが起こった混合物を調べると滑沢剤の分散が偏っていた事例²⁷⁾、過造粒により偏析及び溶出遅延が起きた事例²⁸⁾などが報告されている。また、PATツールとして混合工程での均一性のモニタリングに活用できることが報告されている²⁹⁾。米国ではインターネット経由で国外から輸入される問題のある医薬品の調査に活用した例³⁰⁾が報告されている。この調査の結果、混合状態及び均一性に非常に問題のある錠剤が見

つかっている。このようなケースはHPLCを用いた試験では明らかにならないと考えられ、ケミカルイメージング技術は特に製剤中の粒子やその混合状態の評価に優れている技術と言える。

ケミカルイメージング技術を製剤開発、工程管理に導入することにより製剤に対する理解が高まり、適切なPATの導入に繋がる³¹⁾。またイメージング技術は単独でも混合均一性評価などのPATとして活用できるので、今後応用がさらに発展すると考えられる技術と考えられる。

まとめ

薬局方が基本概念としてきた試験規格による品質確保 (Quality by Tests) に代わり、新たな品質確保のコンセプトとしてQbD (Quality by Design) と呼ばれる概念が広く医薬品規制の場に取り入れられてきている。NIR、テラヘルツ、ラマン分光法のような最新の分析技術により、工程中においてリアルタイムで多数の製品が迅速かつ非破壊で分析されるようになり、日本薬局方もこういった新たな技術を取り入れると共に、品質確保のあり方についてもQbDのようなより進んだ概念を取り込む必要に迫られてきている。

文献

- 1) Holte O, Horvat M. the Ph. Eur. PAT working group. Evaluation of Uniformity of Dosage Units using Large Sample Sizes. *Pharmaeuropal*. 2011; 23: 286-293.
- 2) PhRMA CMC Statistics Expert Team (Bergum J; Vukovinsky KE). A PROPOSED CONTENT UNIFORMITY TEST FOR LARGE SAMPLE SIZES. 2009.
- 3) 香取典子. 薬局方の試験規格をPAT, RTRTへ適用する場合の諸問題-PATにおける製剤均一性試験法の判定基準について. *PHARM TECH JAPAN*. 2013; 29: 7-10.
- 4) Shen M, Tsong Y. Bias of the USP harmonized test for dose content uniformity. *Pharmacoepial Forum*. 2011; 37.

- 5) Hauck WW, DeStefano AJ, Tyle P, Williams RL. Methods for Measuring Uniformity in USP. *Pharmacoepial Forum*. 2012; 38.
- 6) Luypaert J, Massart DL, Van der Heyden Y. Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis. *Talanta*. 2007; 72: 865-883.
- 7) Sulub Y, LoBrutto R, Vivilecchia R, Wabuyele BW. Content uniformity determination of pharmaceutical tablets using five near-infrared reflectance spectrometers: a process analytical technology (PAT) approach using robust multivariate calibration transfer algorithms. *Anal Chim Acta*. 2008; 611: 143-150.
- 8) Tok AT, Goh X, Ng WK, Tan RB. Monitoring granulation rate processes using three PAT tools in a pilot-scale fluidized bed. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2008; 9: 1083-1091.
- 9) De Beer TR, Vercruyssen P, Burqraeve A, Quinten T, Ouyang J, Zhang X, Vervaet C, Remon JP, Baeyens WR. In-line and real-time process monitoring of a freeze drying process using Raman and NIR spectroscopy as complementary process analytical technology (PAT) tools. *J Pharm Sci*. 2009; 98: 3430-3446.
- 10) Mantanus J, Ziémons E, Lebrun P, Rozet E, Klinkenberg R, Streel B, Evrard B, Hubert P. Moisture content determination of pharmaceutical pellets by near infrared spectroscopy: method development and validation. *Anal Chim Acta*. 2009; 642: 186-192.
- 11) Lee MJ, Park CR, Kim AY, Kwon BS, Banq KH, Cho YS, Jeong MY, Choi GJ. Dynamic calibration for the in-line NIR monitoring of film thickness of pharmaceutical tablets processed in a fluid-bed coater. *J Pharm Sci*. 2010; 99: 325-335.
- 12) De Beer TR, Wiqqenhorn M, Veillon R, Debacq C, Mayeresse Y, Moreau B, Burqraeve A, Quinten T, Friess W, Winter G, Vervaet C, Remon JP, Baeyens WR. Importance of using complementary process analyzers for the process monitoring, analysis, and understanding of freeze drying. *Anal Chem*. 2009; 81: 7639-7649.
- 13) Wu H, Khan MA. Quality-by-Design (QbD): an integrated process analytical technology (PAT) approach for real-time monitoring and mapping the state of a pharmaceutical coprecipitation process. *J Pharm Sci*. 2010; 9: 1516-1534.
- 14) Jiang JH, Berry RJ, Siesler HW, Ozaki Y. *Anal Chem*. 2002; 74: 3555-3565.
- 15) Sakamoto T, Fujimaki Y, Takada Y, Aida K, Terahara T, Kawanishi T, Hiyama Y. Non-destructive analysis of tulobuterol crystal reservoir-type transdermal tapes using near infrared spectroscopy and imaging. *J Pharm Biomed Anal*. 2013; 74: 14-21.
- 16) Murayama K, Genkawa T, Ishikawa D, Komiyama M, Ozaki YA. polychromator-type near-infrared spectrometer with a high-sensitivity and high-resolution photodiode array detector for pharmaceutical process monitoring on the millisecond time scale. *Rev Sci Instrum*. 2013; 84: 023104.
- 17) Jiang JH, Berry RJ, Siesler HW, Ozaki Y. *Anal Chem*. 2002; 74: 3555-3565.
- 18) Savitky A, Golay MJE. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal Chem*. 1964; 36: 1627-1639.
- 19) 坂本知昭, 村山広大, 藤巻康人, 小金井誠司, 北川雅博, 小宮山誠, 香取典子, 合田幸広. 高速 NIR 分光器を活用した錠剤含量分析法 - PAT の可能性を探る. *PHARM TECH JAPAN*. 2014; 30: 1-8.
- 20) Sakamoto T, Portieri A, Taday PF, Takada Y, Sasakura D, Aida K, Matsubara T, Miura T, Terahara T, Arnone DD, Kawanishi T, Hiyama T. Detection of tulobuterol crystal in transdermal patches using terahertz pulsed spectroscopy and imaging. *Pharmazie*. 2009; 64: 361-365.
- 21) Sakamoto T, Portieri A, Arnone DD, Taday PF, Kawanishi T, Hiyama Y. Coating and density distribution analysis of commercial ciprofloxacin hydrochloride monohydrate tablets by

- terahertz pulsed spectroscopy and imaging. *J Pharm Innov.* 2012; 7: 87-93.
- 22) Eliasson C, Macleod NA, Jayes LC, Clarke FC, Hammond SV, Smith MR, Matousek P. Non-invasive quantitative assessment of the content of pharmaceutical capsules using transmission Raman spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal.* 2008; 47: 221-229.
- 23) Carriere J, Heyler R, Smith B. Polymorph identification and analysis using Ultralow-Frequency Raman Spectroscopy. *Raman Technology for Today's Spectroscopists.* 2013; June: 44-50.
- 24) 藪崎敬彦, 山領美由紀, 十枝内元子. 原料ID試験における携帯型ラマン分光装置の有用性検証. *Pharm Tech Japan.* 2012; 28: 37-42.
- 25) 小出達夫. *ファルマシア.* 2009; 45: 343-347.
- 26) 小出達夫. 飛行時間型二次イオン質量分析法 (TOF-SIMS) を用いた医薬品の分析. *薬剤学.* 2013; 73: 19-23.
- 27) Clarke FC, Jamieson MJ, Clark DA, Hammond SV, Jee RD, Moffat AC. Chemical image fusion. The synergy of FT-NIR and Raman mapping microscopy to enable a more complete visualization of pharmaceutical formulations. *Anal Chem.* 2001; 73: 2213-2220.
- 28) Koide T, Nagato T, Kanou Y, Matsui K, Natsuyama S, Kawanishi T, Hiyama Y. Detection of component segregation in granules manufactured by high shear granulation with overgranulation conditions using near-infrared chemical imaging. *Int J Pharm.* 2013; 441: 135-145.
- 29) El-Hagrasy AS, Morris HR, D'amico F, Lodder RA, Drennen JK. Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity. *J Pharm Sci.* 2001; 90: 1298-1307.
- 30) Veronin MA, Youan BBC. Magic bullet gone astray: medications and the internet. *Science.* 2004; 305: 481-481.
- 31) 小出達夫, 香取典子, 檜山行雄, 奥田晴宏. PATによる医薬品品質管理の課題と展望. *Pharm Tech Japan.* 2012; 28: 7-10.

高速NIR分光器を活用した錠剤含量分析法

PATの可能性を探る

Rapid quantitative analysis of acetaminophen in tablets using a high-sensitive near infra-red spectrometer -Applicability for PAT

国立医薬品食品衛生研究所¹⁾, 横河電機株式会社²⁾, 東京都立産業技術研究センター³⁾, エーザイ株式会社⁴⁾

坂本知昭¹⁾, 村山広大²⁾, 藤巻康人³⁾, 小金井誠司³⁾,

北川雅博⁴⁾, 小宮山誠²⁾, 香取典子¹⁾, 合田幸広¹⁾

TOMOAKI SAKAMOTO¹⁾, KODAI MURAYAMA²⁾, YASUTO FUJIMAKI³⁾, SEIJI KOGANEI³⁾,

MASAHIRO KITAGAWA⁴⁾, MAKOTO KOMIYAMA²⁾, NORIKO KATORI¹⁾, YUKIHIRO GODA¹⁾

National Institute of Health Sciences¹⁾, Yokogawa Electric Co.²⁾,

Tokyo Metropolitan Industrial and Technology Research Institute³⁾, Eisai Co. Ltd.⁴⁾

緒言

近赤外 (NIR) 分光法は、日米EU医薬品規制調和国際会議 (ICH) Q8 の概念の導入に伴い、プロセス解析工学 (PAT) による品質管理体制の運用における有望な分析法の1つとして製薬分野で注目されてきた。現在までに多くの適用研究がなされ、また第十五改正日本薬局方第二追補から参考情報として、近赤外吸収スペクトル測定法が収載されている。

NIR分光法は多くの固形試料を迅速、非破壊で測定できるだけでなく、光学ファイバプローブを用いて分光器本体から離れた場所にある試料の遠隔測定が可能である。したがって、製薬分野では、工程管理を含めた製造および品質管理現場で、導入のしやすい分析法であり、品質規格・基準のためのオフラインでの分析法として利用されるばかりではなく、プロセス解析ツールの1つとしての応用研究が進められている¹⁻⁹⁾。特に錠剤などの固形製剤中の主薬成分の定量を製造プロセス中に行うことができれば、リリースのための定量試験や製剤試験の一部を効率化できる可能性があり、出荷までの期間の短縮や試験検査に係る人員の低減などにつながるものが期待される。しかしながら工程中で、より多くの錠剤を測定するためには、錠剤中の分析種に由来する分光情報を得るのに必要な透過NIR光について、高速でかつ少ない

積算回数でより高いシグナル/ノイズ (S/N) 比を得ることが可能な、高感度NIR分光検知システムが必要となる。

そこで筆者らは、高速高感度透過測定が可能な分散NIR分光器を用いた錠剤中の主薬成分の迅速定量への適用性を検討した。また、工程中に導入することを想定し、装置の導入適格性の評価に必要な項目ならびに定量分析の妥当性を客観的に評価するための分析バリデーションについて、日本薬局方ならびにICH Q2で提唱されている分析能パラメータに基づく評価を行った。また、倍音領域において比較的吸収バンドのオーバーラップが少ない第二倍音領域の吸収に着目し、主薬成分に由来する特徴的な吸収を用いた単回帰解析と多変量解析による解析アプローチを比較したので、本稿で紹介したい。

1. NIRで得られる情報

NIR領域で得られる吸収は、基準分子振動の中でも特に伸縮振動および変角振動の倍音や結合音である。したがって、主としてC-H、O-H、N-HなどのX-H部分に由来する倍音や結合音などの分光情報がスペクトルに反映されている。これらは分析種の化学構造を反映する分子振動情報として非常に有用である。しかしながら、これらの近赤外領域で観察される結合音および倍音は振動の非調和性により生じるものであり、非調和性は水素結合などの分子間相互作用の影響を強く受ける。すなわち、

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

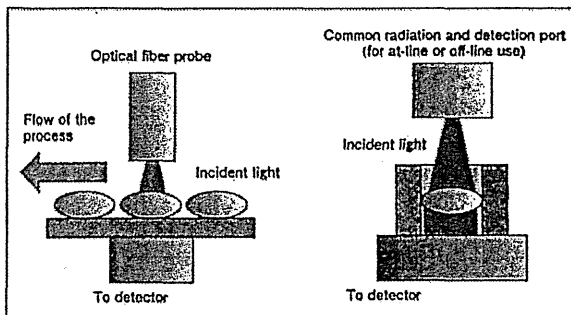


図1 In-line (左側) およびat-lineまたはoff-line (右側) におけるNIR光照射部および検知部のイメージ

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)¹⁾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(10,752.7cm⁻¹~5,763.7cm⁻¹), 1nm,

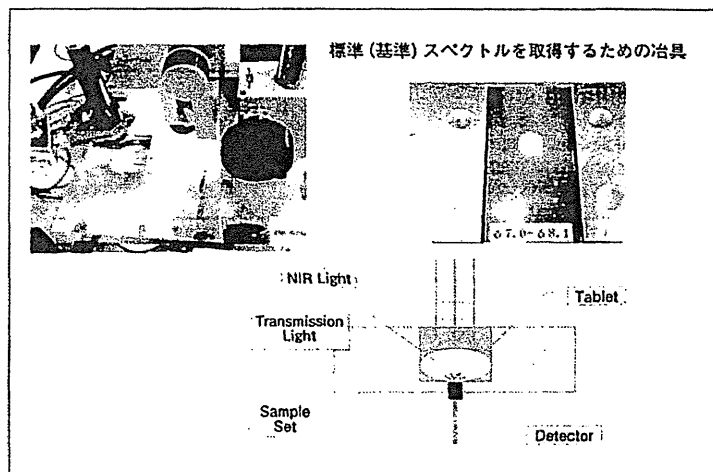


図2 本研究で用いたNIR光の照射・検知部と標準(基準)スペクトル取得のために作製した治具

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8,802cm⁻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						
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。

1) 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

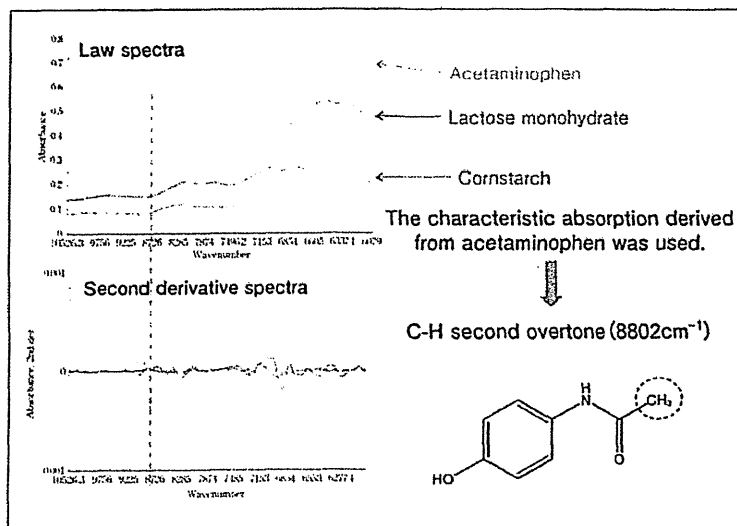


図3 各標準物質から得た透過NIRスペクトル

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 $8\text{w/w}\% \sim 12\text{w/w}\%$ 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:

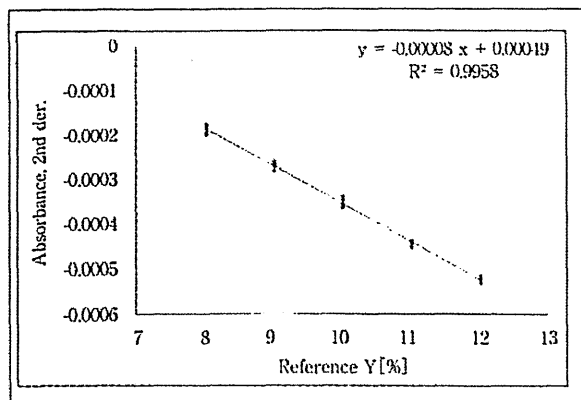


図4 錠剤中の主要成分由来の $8,802\text{cm}^{-1}$ の吸収の二次微分値と濃度の相関

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($10\text{w/w}\%$)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^{-10})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^{-10} 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($10\text{w/w}\%$ 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

PATの可能性を探る

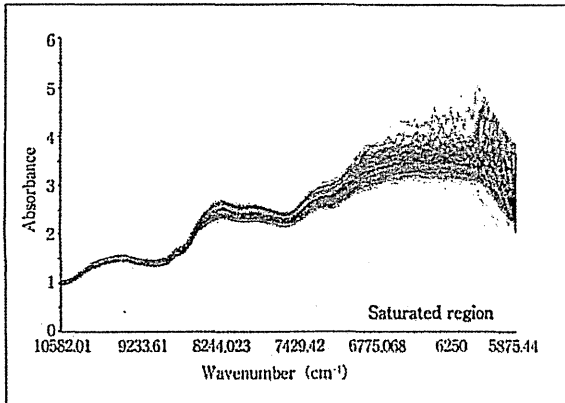


図5 アセトアミノフェン錠から得た透過NIRスペクトル (含量 8w/w%~12w/w%, n=30)

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

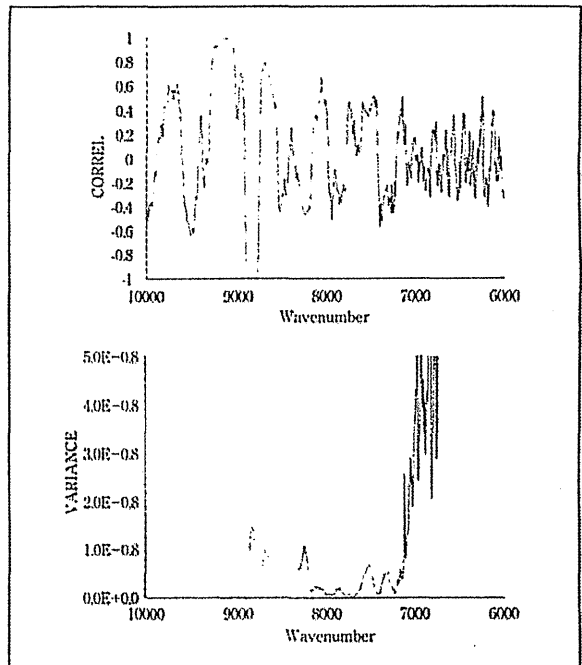


図7 アセトアミノフェンの濃度相関係数と分散プロット

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。8,800cm⁻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8,802cm⁻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ず、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。

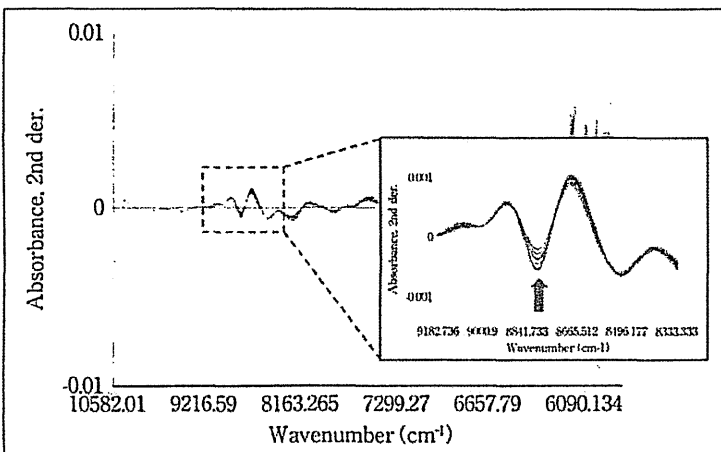


図6 アセトアミノフェン錠から得たNIR二次微分スペクトル (含量 8w/w%~12w/w%, 5水準, 各水準n=6)

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吸収を精査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掃による定量ア

ベルテック社
クリーンルーム用製品
DEC-AHOL-WFI 70% (70% IPA)
STER-AHOL-WFI 70% (70% 変性エタノール)



特徴

- ・cGMPに基く製造設備
- ・USP 注射用水(WFI)で希釈
- ・0.2μmフィルター透過
- ・ダブルバッグ包装
- ・7線照射滅菌済
- ・各種証明書をLot毎に発行
- ・納品毎に添付
- ・分析試験・無菌性試験
- ・7線照射・LAL Test
- ・豊富なバリデーションデータ

試供品あります。

その他、様々な滅菌・消毒・洗浄剤や器材消耗品、モニタリングシステム等の製品がラインナップ化されています。

カタログのご請求、お問合せは下記までお願いします。

テクノケミカル株式会社
〒113-0021 東京都文京区本駒込 1-27-9
TEL: 03-3947-7310 FAX: 03-3947-7306
HP: www.technochemical.com
Email: info@technochemical.com

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. Luypaert, D.L. Massart, Y. Vander Heyden : Talanta, 72, 865-883(2007)
- 2) Y. Sulub, R. LoBrutto, R. Vivilecchia, B.W. Wabuyele: 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. Vercruysee, 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. Klinkenberg, B. Streef, 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. Bang, Y.S. Cho, M.Y. Jeong, G.J. Choi : J. Pharm. Sci., 99, 325-335(2010)
- 7) T.R. De Beer, M. Wiqqenhor, R. Veillon, C. Debaq, 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)

可塑剤は シロフレックス®2 (SC-60)

薬添規収載品

クエン酸トリエチル

水系腸溶性コーティング
及び有機溶媒系コーティング用可塑剤

販売元

ABC株式会社

〒104-0052 東京都中央区月島2-1-1
TEL (03) 3536-4542 FAX (03) 3536-4743
大阪支店 〒541-0041 大阪市中央区北浜1-8-18(大阪駅前第4ビル)
TEL (06) 6206-5075 FAX (06) 6222-7417
<http://www.abc.co.jp>

製造元

森村商事株式会社

〒105-8451 東京都港区虎ノ門1-3-1(森村ビル)
TEL (03) 3502-1635 FAX (03) 3502-2217
大阪支店 〒541-0056 大阪市中央区久太郎町3-6-8(信友ビル)
TEL (06) 4704-5403 FAX (06) 6244-5758
<http://www.morimura.co.jp>

報告書

平成24年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告^{*5}

高速・高感度分散形近赤外分光器を用いた錠剤中主薬成分の定量と 工程内導入への適用性

坂本 知昭^{*1,*}, 村山 広大^{*2}, 藤巻 康人^{*3}, 北川 雅博^{*4}, 小金井 誠司^{*3}, 小宮山 誠^{*2},
檜山 行雄^{*1}, 香取 典子^{*1}, 奥田 晴宏^{*1}

医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス

Vol. 45, No. 4 別刷 (2014年)

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等に関する研究」研究報告^{*5}高速・高感度分散形近赤外分光器を用いた錠剤中主薬成分の定量と
工程内導入への適用性坂本 知昭^{*1,*}, 村山 広大^{*2}, 藤巻 康人^{*3}, 北川 雅博^{*4}, 小金井 誠司^{*3}, 小宮山 誠^{*2},
檜山 行雄^{*1}, 香取 典子^{*1}, 奥田 晴宏^{*1}Study on PAT-applicability for Quantitative Analysis of Acetaminophen in Tablets Using
a High-speed and High-sensitive Near Infra-red SpectrophotometerTomoaki SAKAMOTO^{*1,*}, Kodai MURAYAMA^{*2}, Yasuto FUJIMAKI^{*3},
Masahiro KITAGAWA^{*4}, Seiji KOGANEI^{*3}, Makoto KOMIYAMA^{*2}, Yukio HIYAMA^{*1},
Noriko KATORI^{*1} and Haruhiro OKUDA^{*1}

緒言

近赤外 (Near-infrared: NIR) 領域で得られる分光情報は、化学構造中の C-H, N-H, O-H などの X-H に由来する結合音及び倍音などの化学情報が得られ、測定対象が固形試料の場合には、粒度 (粒径)、硬さ (密度)、充填密度などの物理的情報を含む¹⁾。近赤外領域で観察される結合音及び倍音は振動の非調和性により生じるものであり、非調和性は水素結合などの分子間相互作用の影響を強く受ける。すなわち、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。更に、医薬品など複数の成分が

混在する試料を測定する場合、それぞれの構成成分から得たスペクトルの混合スペクトルが得られる。このため、類似する化学構造をもつ成分が混在する場合には各成分に特徴 (特異) 的な吸収を単独に見いだせないこともある。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、多変量解析 (ケモメトリクス) 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 分光法の様々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。

製薬分野においては、NIR 光を用いて迅速にかつ非破壊に固形試料を測定できる利点が特に注目され、品質規格・基準のためのオフライン試験用の分析装置としての導入ばかりではなく、プロセス解析ツールの一つとしての応用研究が進められている²⁻¹⁰⁾。特に錠剤などの固形製剤中の主

* 責任著者 Corresponding author

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

^{*2} 横河電機株式会社 東京都武蔵野市中町 2-9-32 (〒180-8750)

^{*3} 東京都立産業技術研究センター 東京都江東区青海 2-4-10 (〒135-0064)

^{*4} エーザイ株式会社 埼玉県本庄市南 2-3-14 (〒367-0048)

^{*5} 本研究は、平成 24 年度 (一財) 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団の「日本薬局方の試験法等に関する研究」により実施したものである。

薬成分の定量を製造プロセス中に行うことができれば、リリースのための定量試験や製剤試験の一部を効率化できる可能性があり、出荷までの期間の短縮や試験検査に係る人員の低減などにつながることを期待される。しかしながら、工程中により多くの錠剤を測定するためには、錠剤中の分析種に由来する全分光情報を得るのに必要な透過 NIR 光を高速でかつ少ない積算回数でより高い SN 比を得ることが可能な高感度 NIR 分光検知システムが必要である。そこで著者らは、高速高感度透過測定が可能な分散形 NIR 分光器を用いた錠剤中の主薬成分の迅速定量への適用性を検討した。また、工程中に導入することを想定し、装置の導入適格性の評価に必要な項目並びに定量分析の妥当性を客観的に評価するための分析バリデーションについて、日本薬局方並びに ICH Q2 で提唱されている分析能パラメータに基づく評価を行った。また、倍音領域において比較的吸収バンドのオーバーラップが少ない第二倍音領域の吸収に着目し、主薬成分に由来する特徴的な吸収を用いた単回帰解析と多変量解析による解析アプローチを比較した。

実験方法

1. 装置、測定条件及び方法

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形 NIR 分光器 (プロトタイプ P-NIRs, 横河電機株式会社製)¹¹⁾ を用いた。光源は 100W ハロゲンランプを用いた。測定波長、波長分解能、積算回数 (平均化回数) は 930nm ~ 1735nm (10752.7cm^{-1} ~ 5763.7cm^{-1}), 1nm, 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。錠剤は錠剤透過用治具に固定し、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、測定時間は 1 秒であった。

2. 治具

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。また、錠剤間における径のばらつきを想定し、7.0mm Φ ~ 8.1mm Φ の範囲で数種類の径の穴を開け、錠剤の径に合わせて治具の穴を選択できるようにした。本研究で調製したモデル錠剤は 8.1mm Φ の穴を用いて測定した。

3. 材料

主薬成分として用いたアセトアミノフェン、乳糖一水和物、コーンスターチ、HPC-L 及びステアリン酸マグネシウムは医薬品原末及び医薬品製造用のグレードのものを用

いた。これらの原末はエーザイ株式会社より提供されたものを用いた。

4. 基準スペクトル測定用ペレットの調製と真度の測定

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、錠剤成形器に入れた。10kN で 10 秒間加圧し、ペレットを得た。基準スペクトル測定用ペレットから得た 8802cm^{-1} 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% 信頼区間を算出した。

5. 検量モデル構築のための錠剤の調製

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 錠当たりの質量は 200mg となるようにし、仕込み量は各水準において 4000g とした。添加剤の中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及び添加剤の処方 Table 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。

6. スペクトル解析

6.1 単回帰解析

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 正規化及び二次微分処理 (Savitzky-Golay, Smoothing point: 31point) を行った¹²⁾。各スペクトルの解析及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。

6.2 多変量解析

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。

7. 液体クロマトグラフィーによるアセトアミノフェンの定量

錠剤 1 個に薄めたリン酸 (1 → 1000) と液体クロマトグラフィー用アセトニトリルの混液 (17 : 3) 15mL 及び内標準溶液 (安息香線の移動相溶液 (1 → 500)) 5mL を加え、10 分間超音波を照射した。この液に薄めたリン酸

Table 1 Prescription of Model Tablets

	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%

Model tablets Diameter : Φ8mm, Thickness : 3mm, Weight : 200mg, Batch size : 4000g

(1→1000)と液体クロマトグラフィー用アセトニトリルの混液(17:3)を加えて25mLとし、孔径0.2μmのメンブランフィルターでろ過した、2mLのろ液をとり、薄めたリン酸(1→1000)と液体クロマトグラフィー用アセトニトリルの混液(17:3)を加えて20mLとし、試料溶液とした。試料溶液20μLをHPLCに注入した。装置は紫外外部検出器を備えたLC-10ADvp HPLCシステム(島津製作所製)を用いた。移動相はメタノール(A液)と薄めたリン酸(1→1000)(B液)のグラジエント法(ステップワイズ法)を採用し、A液とB液の比率について、分析開始時(0分)に7:3にそして4分後に3:7に設定した。流速、検出波長は1.0mL/min、280nmにそれぞれ設定した。カラムはSymmetry ODSカラム(4.6mm×150mm、粒径5μm)(Waters製)を用いた。また、自動積分法によりアセトアミノフェンと内標準物質(安息香酸)のピーク面積の比を求めた。錠剤中のアセトアミノフェンの量は、標準物質として用いたアセトアミノフェン原末(ピレチノール、岩城製薬製)20mgをとり、同様に操作して得た標準溶液の20μLをHPLCに注入して得られたアセトアミノフェンと内標準物質のピーク面積の比と比較することにより算出し

た。

実験結果及び考察

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(Fig. 1)。Off-line又は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全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、Fig. 1に示したような非保持の状態での測定が、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。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い。これらの観点から、スペクトル解析の逸脱が生

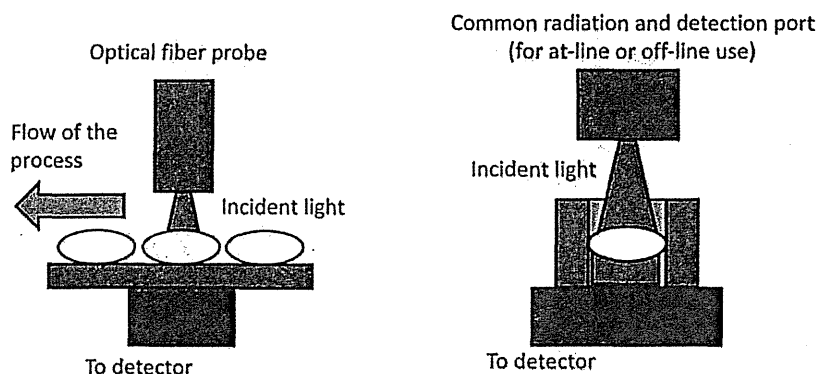


Fig. 1 Comparison of Radiation and Detection Parts at In-line, At-line or Off-line Use

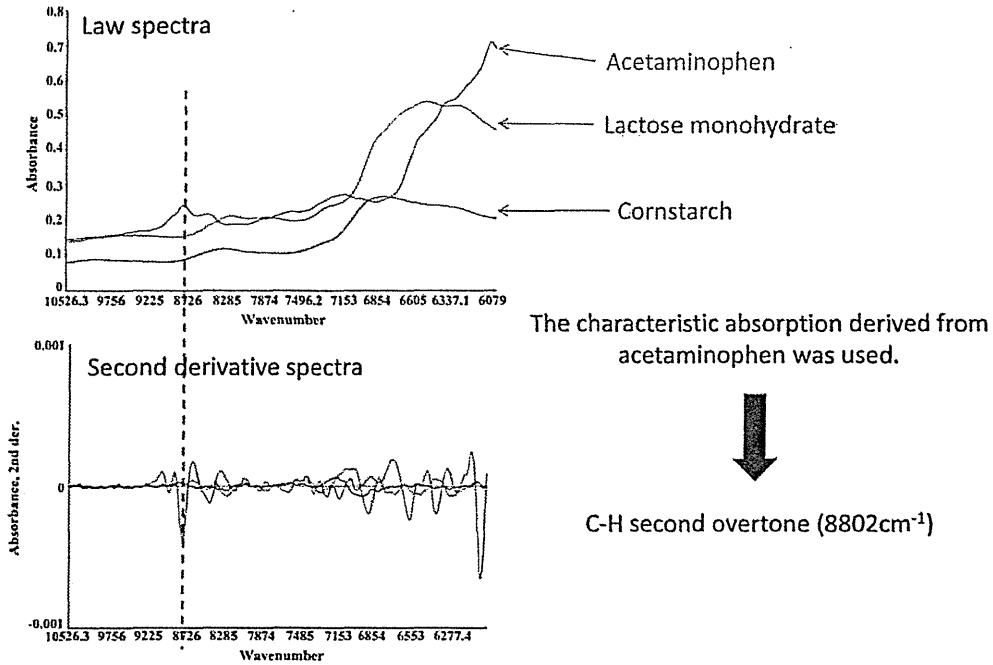


Fig. 2 Transmittance NIR Spectra Obtained from Pure Materials

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確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。治具を設置して得た吸収と設置せずに得たスペクトルでは約 1.6 倍の吸収強度の違いが観察された。治具を用いずに測定した場合には、錠剤を透過し検知部で検知される透過光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、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) ガイドライン Q2 及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た。提唱されている分析能パラメータについて、特異性、真度、精度 (併行精度)、直線性、範囲を評価の対象とした。

2.1 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、コーンスターチ及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 Fig. 2 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収 (ピー

ク位置 8802cm^{-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。

2.2 直線性 (範囲)

アセトアミノフェンの含量 $8\text{w/w}\%$ ~ $12\text{w/w}\%$ までの 5 水準のモデル錠剤 (各水準 $n=6$) から得た 8802cm^{-1} 付近の二次微分吸光度から得た回帰直線を Fig. 3 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)

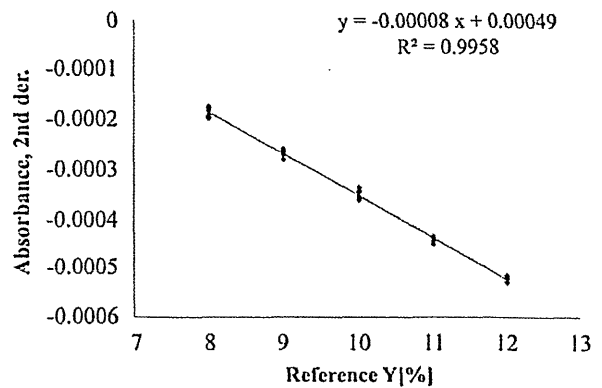


Fig. 3 Correlation between Second Derivative Absorbance (at 8802cm^{-1}) and Acetaminophen Concentration in the Tablets

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; RMSEP)は0.099%であった。

2.3 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8802cm⁻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-8.46e⁻⁶~8.46e⁻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-0.029~0.029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。

2.4 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、8718.4cm⁻¹~9354.5cm⁻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。

4. HPLC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. 透過光を用いた錠剤中アセトアミノフェンの定量性と第二倍音領域の有用性

近赤外領域のうち高波数側は、C-H, O-H及び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、第二倍音領域の方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、特徴的なバンドの抽出ができる可能性が高くなる。しかしながら、高次倍音領域は一般的にエネルギーが弱いため、透過性は優れるものの定量分析に用いる際には低いシグナル・ノイズ(SN)比が定量性に影響を与えることもある。この点について、分散形NIR分光器では高次倍音領域においても良好なSN比を得ることが可能ではあるが、フーリエ変換形分光器を用いた測定と比較して、1回当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。しかしながら、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を用いることで、迅速に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となり、本領域の定量分析への適用が期待される。

錠剤から得られた透過スペクトルをFig. 4に示す。透過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

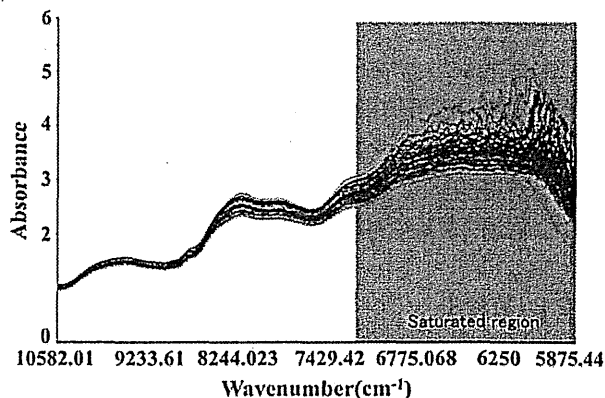


Fig. 4 Transmittance NIR Spectra Obtained from Acetaminophen Tablets