

## Agilent Cary 60 UV-Vis による米国薬局方 モノグラフのメソッド検証

USP モノグラフに従った硫酸マグネシウム中の鉄不純物の  
定量



### 著者

Ciaran Worth, Wesam Alwan,  
and Fabian Zieschang  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

本研究では、Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計を使用して、硫酸マグネシウム中の鉄不純物の定量に関する米国薬局方（USP）モノグラフを検証する方法について説明します。Cary 60 に 18 セルマルチセルチェンジャを取り付けて、Agilent Cary WinUV ソフトウェアで制御することにより、ブランク、標準、サンプルを自動分析しました。検証されたメソッドを使用して、2 種類の硫酸マグネシウムサンプル中の鉄の相対重量を、規限度値  $0.5 \mu\text{g/g}$  未満で測定しました。結果から、医薬品関連の品質管理アプリケーションに Cary 60 が適していることを確認しました。

## はじめに

政府機関は、国内水準および国際水準において、医薬品の安全性、効能、品質、ラベル表示を保証するために医薬品を規制しています。これらの機関は、医薬品の開発者およびメーカー向けに医薬品のモノグラフを公表しており、研究、開発、製造のプロセス全体を通して一貫した品質基準を維持するのを支援しています。米国薬局方 (USP)、欧州薬局方 (Ph. Eur.)、英国薬局方 (BP)、日本薬局方 (JP)、中国薬局方 (ChP) などの主要な薬局方は、公定書の一部として医薬品のモノグラフを公表しています。モノグラフは、許容限度内の不純物の測定を含む、医薬品の定量メソッドを提供しており、規制要件に適合するために不可欠なものです。UV-Vis 分光光度計は、さまざまな医薬品のモノグラフで一般的に指定されている技術です。

医薬品適正製造基準 (GMP) によれば、医薬品を分析するために使用される技術を評価して、実際の使用条件下での適合性を判断する必要があります。USP は、USP General Chapter <1226> 「Verification of Compendial Procedures (公定手順の検証)」に公定手順の検証に関する一般的な情報を、USP General Chapter <857> 「Ultraviolet-Visible Spectroscopy (UV-Vis 分光法)」に UV-Vis 分光技術に関する具体的なガイダンスを記載しています<sup>1, 2</sup>。

以前のアプリケーションノートでは、Cary 60 UV-Vis 分光光度計と Cary WinUV ソフトウェアを使用して、USP <857> に記載されている多くの検証試験で要求される測定を実施しました<sup>3</sup>。本研究では、USP 硫酸マグネシウムのモノグラフに従った、硫酸マグネシウム中の鉄を定量するためのメソッド検証に、18 セルマルチセルチェンジャを取り付けた Cary 60 UV-Vis を使用する方法的例を示しています<sup>4</sup>。

## Cary 60 UV-Vis

Cary 60 UV-Vis は、柔軟性、性能、信頼性に優れた UV-Vis システムであり、さまざまな物質のルーチン分析を実施する製薬ラボに最適です (図 1)。Cary 60 UV-Vis は、主に強力なキセノンランプ光源により、高品質なデータ採取と低所有コストをともに実現しています。10 年保証からもわかるように、ランプの高い堅牢性と信頼性により、交換や再バリデーションの潜在的なコストを削減して、機器の稼働時間を最大化します。

Cary 60 UV-Vis は、独立監査を受けており、環境負荷低減のための My Green Lab で検証済みの ACT ラベル (Accountability = 説明責任、Consistency = 整合性、Transparency = 透明性) を取得しています。このラベルには、Cary 60 UV-Vis がライフサイクル全体を通して環境に与える影響に関する情報が記載されています。

Cary 60 UV-Vis は、生産性や科学的進歩を妨げることなく、ラボの環境負荷を改善します。



図 1. Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計には、キセノンランプの 10 年交換保証が含まれています。

## 実験方法

### 試薬

- 希釈塩酸 (HCl) 水溶液：1 mL の HCl を 1,000 mL の水に希釈
- 溶液 A：500 mg/mL の酢酸アンモニウム水溶液
- 溶液 B：13.4 mg/mL のアスコルビン酸水溶液
- 発色試薬：3.8 mg/mL の 3-(2-ピリジル)-5,6-ジ-(2-フリル)-1,2,4-トリアジン-5',5''-ジスルホン酸二ナトリウム塩
- 標準鉄原液：1.0 µg/mL 鉄希釈 HCl 水溶液

### ブランク、標準、およびサンプル溶液の調製

USP 硫酸マグネシウムのモノグラフ<sup>4</sup> には、UV-Vis による 3 種類の既知標準溶液の分析に基づいて、最も適合する直線から計算される、硫酸マグネシウムサンプル中の鉄の相対質量の定量について記載されています。

すべてのガラス容器を、希釈 HCL 水溶液で洗浄しました。2.0 mL、5.0 mL、10.0 mL の標準鉄原液を別々の 50 mL 計量フラスコに移し、希釈 HCL 水溶液で 35 mL に希釈して、3 種類の標準を調製しました。ブランク溶液は、35 mL の希釈 HCL 水溶液 を 50 mL の計量フラスコに移して調製しました。すべての原液は、試験当日に調製しました。

10 g の硫酸マグネシウム (CAS 番号 7487-88-9) を 50 mL の計量フラスコに移し、希釈 HCL 水溶液で 35 mL に希釈して、2 種類のサンプル溶液を調製しました。サンプル溶液中の鉄の濃度は、設定したマトリックス適合検量線を用いて測定しました。

表 1. 硫酸マグネシウム中の鉄の相対質量の計算に使用する標準溶液

標準溶液	鉄の濃度 (mg/L)	標準溶液中の鉄の質量 (µg)
標準溶液 1	0.04	2
標準溶液 2	0.1	5
標準溶液 3	0.2	10

### 使用機器

Cary 60 UV-Vis に 18 セルマルチセルチェンジャを取り付け、Cary WinUV ソフトウェアで制御しました。マルチセルチェンジャは自動的に移動して、各キュベットを順番に配置することができるため、最大 18 キュベットの自動測定が可能です。そのため、マルチセルにより、1 つのメソッドで複数の標準、サンプルを自動で繰り返し分析できるようになり、生産性が大幅に向上しました<sup>5</sup>。測定は、室温で光路長 1 cm のセルを用いて行いました。

Cary WinUV Concentration アプリケーションソフトウェアを使用して、定量メソッドを作成し、ブランク、標準、サンプルの測定値を採取しました。このメソッドにより、自動的にブランク減算を行い、濃度カーブを確立して、サンプル中の鉄の濃度を計算しました。メソッドパラメータを表 2 に示します。

表 2. Agilent Cary 60 UV-Vis メソッドで使用される Agilent Cary WinUV Concentration アプリケーションのパラメータ

パラメータ	設定値
分析波長	594 nm*
信号平均化時間 (SAT)	0.5 秒
スペクトルバンド幅 (SBW)	1.5
標準の数	3
サンプル数	2

\* USP 硫酸マグネシウムのモノグラフで規定<sup>4</sup>

## 結果と考察

### メソッド検証

USP <857><sup>2</sup>に記載されている UV-Vis メソッドの検証プロセスには、以下の要件が含まれています。

**測定の正確度：**測定の正確度は、必要なマトリックス内の既知濃度の分析対象物の回収試験を通して測定することができます。

硫酸マグネシウム中の鉄の測定試験の正確度は、公称濃度 0.1 mg/L の硫酸マグネシウムの 3 種類の標準サンプルに、2 mL、4 mL、6 mL の 0.2 µg/mL の鉄標準溶液をスパイクすることにより測定しました。鉄の濃度は、6 回の繰り返し測定（繰り返し分析）を行い、各スパイク溶液の平均吸光度を計算することにより算出しました。次に、式 1 を用いて回収率を算出しました。

#### 式 1.

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{C_1}{C_2} \times 100$$

各項の説明：

C<sub>1</sub> = 測定濃度

C<sub>2</sub> = 計算濃度

硫酸マグネシウム中の鉄の想定濃度値の 100 ± 6 % という回収率の結果 (表 3) は、USP <857> が不純物分析における平均回収率として規定している許容限度 80.0 ~ 120.0 % 以内と良好でした。

**表 3.** Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計を用いた、3 種類の濃度で鉄標準 (0.2 mg/L) をスパイクした 3 種類の硫酸マグネシウムサンプルの回収率分析の結果

硫酸マグネシウムの正確度サンプル	公称濃度 (mg/L)	スパイク標準の量 (mL)	計算濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	回収率 (%)
1	0.100	2	0.1166	0.1104	94.6
2		4	0.1286	0.1218	94.8
3		6	0.1375	0.1403	102.0

**測定精度：**精度または再現性は、同様に調製した 6 種類のサンプル溶液の濃度を、100 % のアッセイ試験濃度で測定し、その相対標準偏差 (RSD) を計算することにより評価することができます。

硫酸マグネシウム中の鉄の試験の精度を、公称濃度 10 µg の 50 mL の分析マトリックス中の鉄の標準溶液を、6 つの部分に分割して測定しました。次に、Cary 60 UV-Vis を使用して、18 セルチェンジャにロードされた 6 つの部分の吸光度を 594 nm で測定しました。WinUV Concentration アプリケーションソフトウェアのサンプル平均化機能を使用して、6 種類の繰り返し分析サンプルすべてを同じ分析内で測定しました。測定の再現性は、各サンプルの測定濃度の RSD を計算することにより評価しました。RSD は 1.8 % であり、USP <857> で規定されている基準である 15.0 ~ 20.0 % 以下でした。

**表 4.** 硫酸マグネシウムの 6 回の繰り返し分析サンプル中の鉄の精度測定

サンプル	吸光度	サンプル濃度 (mg/L)
サンプル 1-1	0.1864	0.1894
サンプル 1-2	0.1884	0.1924
サンプル 1-3	0.1929	0.1993
サンプル 1-4	0.1898	0.1946
サンプル 1-5	0.1881	0.1920
サンプル 1-6	0.1875	0.1911
標準偏差 (SD)	0.002276	0.00348
%RSD	1.205	1.802113

**特異性：**標準とサンプルマトリックスからのスペクトル範囲に干渉がないことを実証することにより、特異性を確保することができます。

ブランクと公称濃度 0.2 mg/L の標準鉄溶液の波数スキャンを、Cary WinUV Scan アプリケーションソフトウェアで実行しました。図 2 は、鉄溶液中の発色試薬 (3-(2-ピリジル)-5,6-ジ-(2-フリル)-1,2,4-トリアジン-5',5''-ジスルホン酸二ナトリウム塩) の測光応答を、鉄を含まない同じ溶液 (ブランク溶液) と比較したものであり、594 nm のターゲットピーク付近を示しています。ブランク溶液は、分析スペクトル範囲において測光反応を示しておらず、この範囲に干渉がないことを示しています。

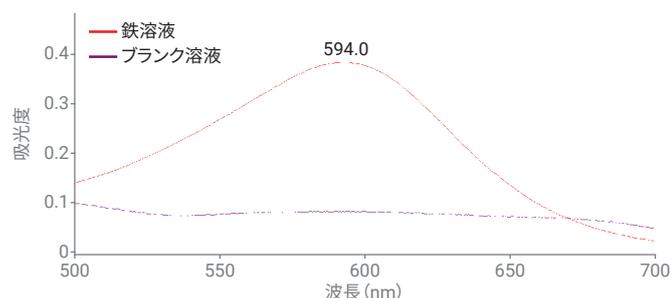


図 2. 鉄を含む溶液に添加した発色試薬と、ブランク溶液 (鉄なし) に添加した同じ試薬の波長スキャンの比較

**定量下限 (QL)：**鉄の QL は、ブランク溶液の 6 回の繰り返し分析測定 of SD を計算して、その値に 10 を乗算することで推定しました。この試験では、推定 QL は 0.00231 mg/L と計算されました。この推定定量下限を確認するには、限度値におけるこの測定の S/N 比が 10 より大きく、この濃度での測定が正確かつ精密であると判断される必要があります。最終的に QL は、モノグラフで規定された限度値の  $\leq 50\%$  であれば有効とみなされます。

表 5. ブランク溶液の 6 回の繰り返し分析測定の計算濃度と鉄の推定 QL

繰り返し回数	濃度 (mg/L)
1	0.00776
2	0.0075
3	0.00776
4	0.00802
5	0.00762
6	0.00736
SD	0.000231
QL	0.002319

Cary 60 UV-Vis 手順の検証に成功したことから、USP モノグラフに従った硫酸マグネシウム中の鉄の分析を、高い信頼性で実施できます。この検証により、機器および実験パラメータが、実際の使用条件に適していることが確認されました。

**硫酸マグネシウム中の鉄の測定：**硫酸マグネシウム中の鉄の相対質量を測定するために、USP モノグラフでは、分析マトリックス中の鉄の 3 種類の標準溶液の吸光度値を用いて、検量線を作成する必要があることが規定されています。その後、硫酸マグネシウムサンプル中の鉄の相対質量を、式 2 を用いて求めることができます。

分析マトリックスを調製するために、標準、サンプル、ブランク溶液のそれぞれに、5 mL の溶液 B と発色試薬をそれぞれ添加しました（「実験方法」のセクションを参照）。その後、各溶液を希釈 HCL 水溶液で容量 50 mL にしました。

ブランク溶液を基準に各標準溶液の吸光度を測定し、図 3 に示すように、鉄含有量に対してプロットしました。

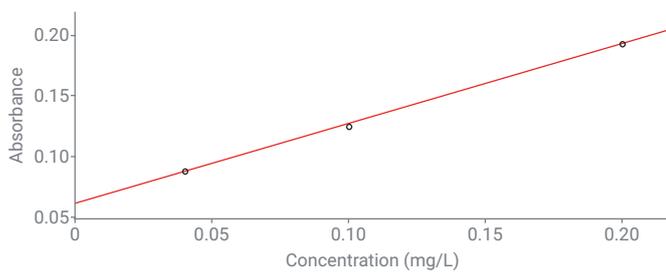


図 3. Agilent Cary 60 UV-Vis を用いた、マトリックス適合させた 3 種類の鉄標準溶液の測定に基づいて作成した検量線

次に、2 種類のサンプル溶液の吸光度値を測定して、その測定値から、硫酸マグネシウムの質量に対する鉄含有量を式 2 に従って算出しました。

式 2.

$$\text{結果} = \frac{C}{W}$$

各項の説明：

C = サンプル溶液中の鉄含有量 (µg)

W = サンプル溶液中の硫酸マグネシウムの重量

表 6. 2 種類の硫酸マグネシウムサンプル中の相対鉄含有量

硫酸マグネシウムサンプル	鉄含有量 (µg)	結果 (µg/g)
サンプル 1	3.1	0.31
サンプル 2	2.5	0.25

鉄の結果は、USP モノグラフで規定された上限値である、0.5 µg/g 以下という許容基準内に収まりました。

## 結論

Agilent Cary 60 UV-Vis と 18 セルチェンジャを使用して、USP モノグラフの UV-Vis 公定手順を検証できることを示しました。Agilent Cary WinUV ソフトウェアと 18 セルチェンジャにより、USP バリデーション試験で要求される複数の繰り返し分析測定を自動化して、オペレータの作業負担を軽減しました。バリデーション試験には、測定の正確度、精度、特異性の確認、定量下限の決定などが含まれています。

メソッドを検証した後、Cary 60 UV-Vis を使用して、USP 硫酸マグネシウム公定手順に従い、2 種類の硫酸マグネシウムサンプル中の鉄含有量を測定しました。結果は、0.5 µg/g 未満というその物質の許容基準内でした。

Cary 60 UV-Vis は、ルーチンの医薬品品質保証/品質管理 (QA/QC) ワークフローおよび研究開発アプリケーションに最適です。オプションの Agilent Cary WinUV Pharma ソフトウェアは、US FDA 21 CFR Part 11、EU Annex 11、および国内の電子記録に関する類似の規則で定義されているコンプライアンスもサポートします。

## 参考文献

1. United States Pharmacopeia. General Chapter, <1226> Verification of Compendial Procedures. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, **2024**. DOI: [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M870\\_03\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M870_03_01)
2. United States Pharmacopeia. General Chapter, <857> Ultraviolet-Visible Spectroscopy. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, **2022**. DOI: [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M3209\\_03\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M3209_03_01)
3. Spectroscopy Solutions for Pharmaceuticals: Confidence in Compliance to USP <857> Using the Agilent Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer, Agilent Technologies white paper, publication number 5991-7269EN, **2016**.
4. United States Pharmacopeia. USP Monographs, Magnesium Sulfate. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, **2024**. DOI: [https://doi.usp.org/USPNF/USPNF\\_M47040\\_06\\_01.html](https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M47040_06_01.html)
5. Agilent 18 セルチェンジャアクセサリによるラボ効率の向上, アジレント・テクノロジー技術概要, 資料番号 5994-7250JAJP, **2024**.

## 詳細情報

- Cary 60 UV-Vis 分光光度計
- UV-Vis アプリケーション用 Cary WinUV ソフトウェア
- UV-Vis 分光分析と分光光度計の基礎サイト

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE-001364

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, November 12, 2024

5994-6929JAJP