

## UV-Vis 測定における データインテグリティの向上と 分析データのばらつきの排除

Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計による検量線と  
複数サンプルの同時測定



### 著者

Dr. Matthew Quinn

Agilent Technologies, Inc.  
Melbourne, Victoria, Australia

### 概要

一般に、医薬品分野の品質保証/品質管理 (QA/QC) プロセスでは、医薬品の製造中および製造後に、治療効果のある成分と賦形剤を定期的にモニタリングする必要があります。そのための手段として確立されているアプローチの 1 つが、検量線を使用した UV-Vis 分光光度計による濃度の測定です。この分析法は信頼性が高い一方、測定データにばらつきが生じ、これによってデータインテグリティが損なわれる可能性があります。このようなばらつきの原因として最も可能性が高いのは、機器または環境に起因する誤差やオペレータエラーです。

アセチルサリチル酸 (ASA) は、抗リウマチ薬、抗炎症薬、および一般的な疼痛緩和薬として広く用いられているアスピリンの有効成分です (1)。今回の研究では、Cary 3500 UV-Vis 分光光度計でのみ可能なアプローチを実証するために、この成分を使用しました。一般的な多くの医薬品と同様に、アスピリン錠剤のほとんどは、医薬品有効成分 (API) に添加された結合剤、着色剤、可溶化剤など、有効成分以外の薬剤で構成されています。

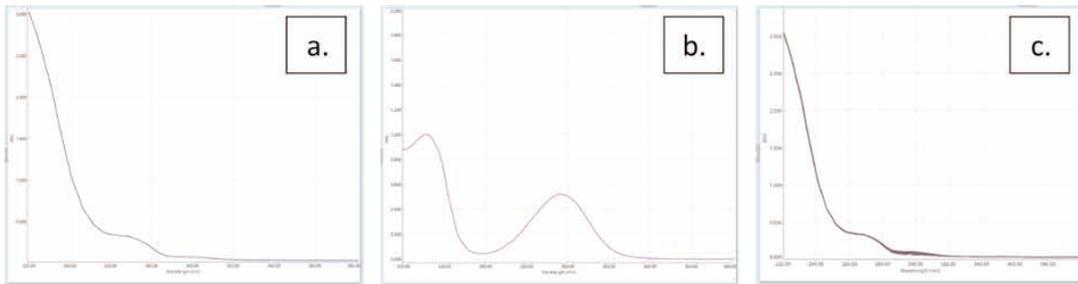


図 1. (a) ASA の吸光スペクトル、(b) SA の吸光スペクトル、(c) 加水分解反応の進行を示す 25 °C、4 時間後の ASA サンプルの吸光度信号

ASA の構成比率は、ASA を脱アセチル化形態であるサリチル酸 (SA) に加水分解することにより、容易に測定できます。SA への加水分解後、UV-Vis 吸光度を測定して検量線と比較することにより、SA を定量します。

環境由来の誤差にはさまざまな原因が考えられますが、わずかな温度変化や水との接触によって吸光度信号が著しく変化することもその 1 つです。ASA は水と接触すると非常に不安定になります。室温下でも SA への加水分解が進み (図 1)、結果的な吸光プロファイルはまったく異なったものになります。

この不安定性は、従来の UV-Vis 分光光度計を使用する場合に、特定の温度と pH 条件下で非常に迅速に分析する必要があることを意味します。または、ASA を SA に変換してから濃度を測定する方法もあります。このアプローチでは、最初に遊離サリチル酸がまったく存在していないことが前提となりますが、実際にはそうでないことが示されています (2)。図 2 に示すように、温度の上昇は、加水分解に寄与する重要な要因になり得ます。すなわち、このサンプルに関しては、潜在的な環境由来の誤差を最小限に抑えることを重視する必要があるということです。

多くの実験計画には、オペレータエラーを防ぐ手段として、繰り返し分析の実施が盛り込まれます。ただし、サンプル前処理における意図的または意図外の偏りや、測定誤差につながるサンプル測定間の偶発事象も誤差原因になる可能性があり、これらの誤差は繰り返し分析では対処できません。Cary 3500 マルチセル

UV-Vis では、8 つのキュベット位置の同時測定が可能のため、合計 7 つのスタンダードとサンプル (および 1 つのコントロール) をまったく同じ条件下で同時に分析することができます。つまり、Cary 3500 マルチセル UV-Vis は、サンプル、スタンダード、およびコントロールの同時測定という新たな方法でデータインテグリティを確保します。この機能により、環境およびオペレータ由来の分析データのばらつきや、結果的にデータ精度におよぶリスクが排除されます。

Cary 3500 には、機器に起因するばらつきを最小化する重要な機能も搭載されています。例えば、この機器にはアライメントを必要とする可動部がないため、サンプルホルダのアライメント不備による誤差を防ぐことができます。また、サンプルとスタンダードの同時測定が可能のため、機器性能やキャリブレーションの経時変化による誤差も回避できます。このように、Cary 3500 を使用することで、機器由来の誤差によって生じる可能性のあるばらつきを最小限に抑えることが可能です。

このアプリケーションノートでは、市販のアスピリンサンプルの構成比率を測定した結果を紹介します。この分析では、サンプルを塩基加水分解した後、296 nm の吸光度を測定しました。吸光度の測定時に 6 つのスタンダードと 1 つのサンプルを同時に測定することで、誤差原因になり得る環境、オペレータ、および機器由来の要因を最小限に抑えることができました。

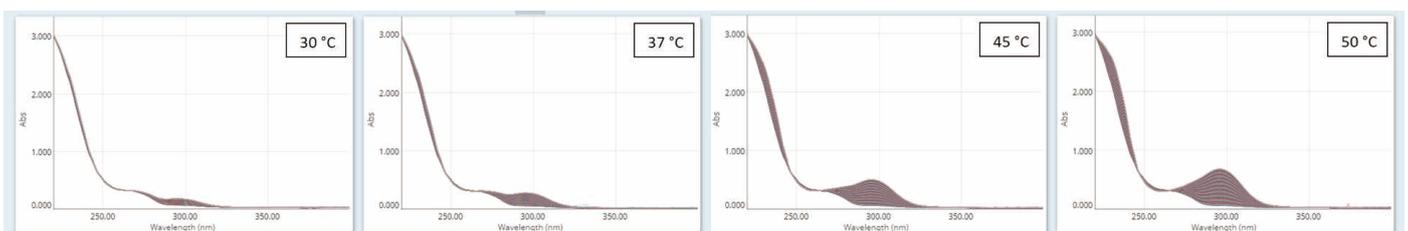


図 2. 30、37、45、および 50 °C での 4 時間にわたる ASA から SA への変換。温度に伴い反応率が高まっていることがわかります。

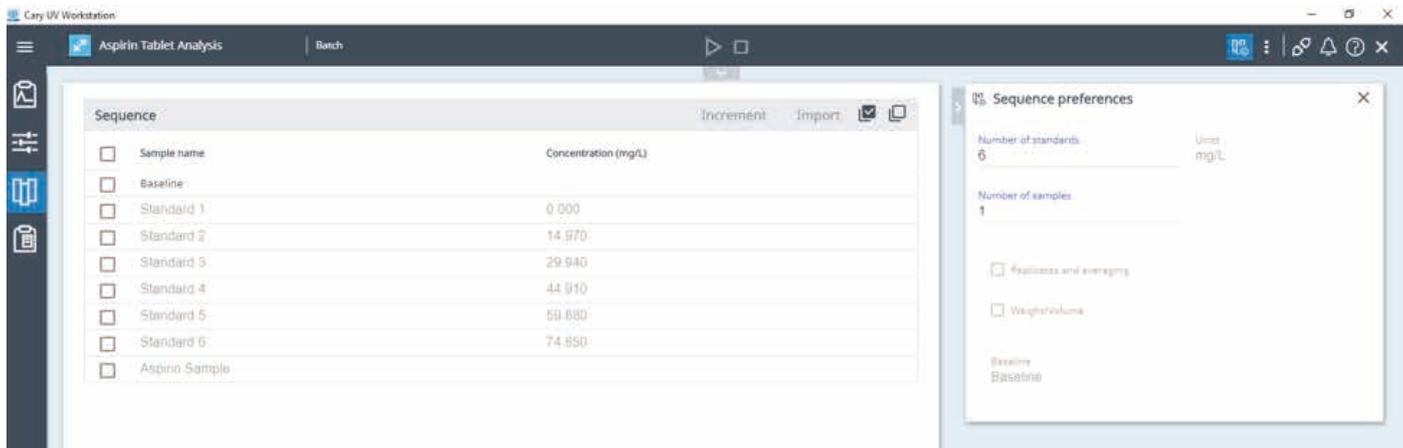


図 3. Cary UV ワークステーションの Concentration アプリケーションの「Sequence」ページ。ベースラインの選択、スタンダードとサンプルの数、単位の選択、およびスタンダードの濃度が表示されています。

## 実験方法

### スタンダード溶液の調製

SA の検量線を作成するために、Milli-Q ろ過水で調製して pH 7.5 に調整したリン酸緩衝液 (PBS) に 2 g の純 SA を溶解し、スタンダード溶液を調製しました。検量線の作成に使用したスタンダード溶液の濃度を表 1 に示します。これらの濃度を使用することで、吸光度範囲が約 0 ~ 2 吸光度単位の検量線を確立することができました。

表 1. 調製したスタンダードの濃度

スタンダード番号	濃度 (mg/L)
スタンダード 1	0
スタンダード 2	14.97
スタンダード 3	29.94
スタンダード 4	44.91
スタンダード 5	59.88
スタンダード 6	74.85

### 市販アスピリン錠剤の塩基加水分解

市販のアスピリン錠剤サンプルを購入しました。錠剤を計量したところ、163.7 mg でした。これを 75 °C の Milli-Q ろ過水で溶解し、1 M 水酸化ナトリウムで pH を約 12 に調整しました。サンプルをこれらの条件下で 1 時間維持し、ASA を SA に完全に加水分解させました。

その後、サンプルを 1 L にしてから、検量線の範囲内に収まるように希釈し、pH を 7.5 に調整しました。

### 装置構成

今回の研究には、8 つのキュベットを同時に測定できる Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計を選択しました。この機能により、それぞれの測定を同じ条件下で行うことができます。

表 2. 機器パラメータ

パラメータ	設定
波長範囲 (nm)	400 ~ 250
スペクトルバンド幅 (nm)	2
シグナル平均化時間 (s)	0.4
データ間隔 (nm)	1
スライス波長 (nm)	296
ゾーン構成	1 ゾーン

スキャンを行うために、2.5 mL のスタンダードとサンプルをそれぞれ 3.5 mL 石英製キュベットに移し、コントロールには Milli-Q 水を使用しました。7 つのすべてのポジションが 1 つのコントロールと同時に測定されるように、Cary UV ワークステーションの Concentration アプリケーションでシングルゾーンを選択しました。使用したパラメータは表 2 のとおりです。

調製したスタンダードの濃度を入力し、ベースラインを適用しました (図 3)。アスピリン錠剤サンプルに加え、検量線を作成するために合計 6 つのスタンダードを選択しました。

まず、各キュベット位置のベースラインを収集しました。次に、スタンダードとサンプルを 1 回の同時測定により測定しました。

## 結果と考察

### 検量線と錠剤サンプルの同時分析

波長スキャンを 400 ~ 250 nm の範囲で実行することにより、SA のピークの定性および定量分析を行うことができました。このスキャンから、ピーク最大値が 296 nm に位置することがわかりました。すべてのスタンダードとサンプルは、Cary 3500 マルチセル UV-Vis を使用して同時に分析しました。これは、すべてのスタンダードとサンプルが同時に、すなわちまったく同じ条件下で測定されたことを意味します。

6 つのスタンダードとサンプルの波長スキャン後、それぞれの 296 nm における吸光度測定値が特定されました。このデータから検量線が作成され、錠剤サンプルの濃度が計算されました。その結果、アスピリン錠剤サンプル中の SA の濃度が 7.755 mg/L (希釈係数を考慮すると 77.55 mg/L) であることがわかりました。この濃度は、錠剤中の ASA 101.15 mg に相当します (図 4)。

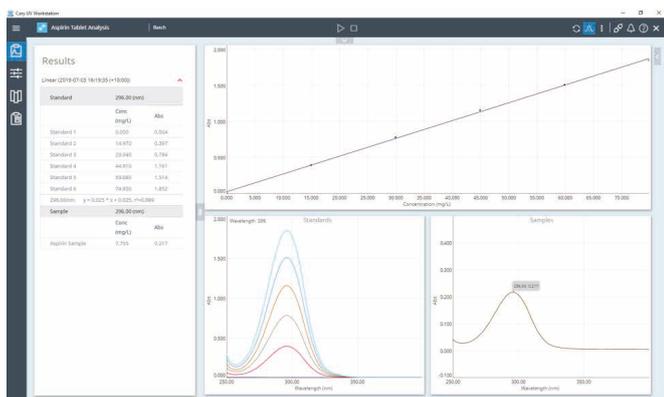


図 4. SA の検量線 (上段右) と、スタンダード (下段中央) および錠剤サンプル (下段右) の関連スキャンが表示された Cary UV ソフトウェア。画面の左側では、一次方程式および相関係数と、296 nm における生データ値を確認できます。

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。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2019  
Printed in Japan, August 12, 2019  
5994-1206JAJP

計量したサンプル錠剤の質量から、構成比率を計算することができます。低用量アスピリン錠剤全体の質量が 163.7 mg、分析により求めた錠剤中の ASA の質量が 101.15 mg であったことから、錠剤中の ASA の構成比率は 61.70 % であることがわかりました。

## 結論

市販のアスピリン錠剤を購入し、塩基加水分解しました。結果的な溶液で SA の濃度を測定し、その値をもとに ASA の含有量を求めました。そのために、SA の検量線を作成し、すべてのスタンダードとサンプルを同一条件下で同時に分析しました。このアプローチにより、測定結果に影響する環境、機器、またはオペレータ由来の誤差リスクが排除されました。分析結果から、錠剤中の ASA の質量が 101.15 mg、すなわち錠剤中の構成比率が 61.70 % であることがわかりました。

Cary 3500 マルチセル UV-Vis は、サンプル、スタンダード、およびコントロールの同時測定という新たな方法でデータインテグリティを確保します。この機能により、環境およびオペレータ由来の分析データのばらつきや、結果的にデータ精度におよぶリスクが排除されます。

## 参考文献

1. Erkan D, Harrison MJ., Levy R., Peterson M., Petri M., Sammiriatno L., Unalp-Arida A., Vilela Y., Yazici Y., Lockshin MD. Aspirin for primary thrombosis prevention in the antiphospholipid syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asymptomatic antiphospholipid antibody-positive individuals, *Arthritis Rheum*, **2007**, 7, 2382-91.
2. Wang Y., Xu P., Li X., Nie K., Tuo M., Kong B., Chen J. Monitoring the hydrolyzation of aspirin during the dissolution testing for aspirin delayed-release tablets with a fiber-optic dissolution system, *J Pharm Analysis*, **2012**, 2, 386-389.