

透過型 FTIR による液体サンプルの 高速かつ簡単で信頼性の高い測定

Agilent Cary 630 FTIR によるシメチコン定量における
DialPath モジュールと従来の液体セルとの比較

著者

Fabian Zieschang
Wesam Alwan
Agilent Technologies, Inc.



はじめに

フーリエ変換赤外 (FTIR) 分光法は、製薬業界で一般的に使用されている手法であり、最終医薬品の品質管理において重要な役割を果たします。しかし、透過型 FTIR を用いた液体医薬品サンプルの正確で精度の高い測定は、取り外し可能なセルまたはフローセルを用いると困難なことがよくあります。液体分析にこれらのセルを使用すると次のような問題があり、複雑でエラーが発生しやすく、時間がかかってしまうことがあります。

- セルが壊れやすく、スペーサーやウィンドウの組み立てが難しい
- セルの設計により、再現性のある光路長を実現することが困難である
- セルが漏れやすい
- 気泡により分析が妨げられる
- セルの洗浄や組み立てに時間がかかる
- 粘性や粘着性のあるサンプルの測定が難しい
- サンプル量や洗浄用溶媒量が非常に多く必要である

Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計用の独自のサンプリングモジュールである Agilent DialPath を利用すれば、従来のフローセルや取り外し可能な液体セルが不要となり、液体サンプルの分析が簡単になります。図 1 (中央) と図 2 に示すように、DialPath モジュールでは水平に配置された 2 つのウィンドウの間に液体サンプル数滴を置きます。2 つのウィンドウ間の距離が光路長を定義します。



図 1. DialPath モジュール付きの Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計では、3 つの簡単なステップで液体サンプルの分析ができます。

DialPath モジュールでは、モジュールヘッドを回すことであらかじめ設定された 3 つの光路長が即時に選択（「ダイヤルイン」）できます。DialPath モジュールと同じ技術を利用する Agilent Tumbler モジュールで使える光路長は、3 つではなく 1 つです。両方のモジュールとも恒久的にアライメントされており、Cary 630 FTIR エンジンの前面に簡単に取り付けられます。Agilent MicroLab ソフトウェアが Cary 630 FTIR エンジンに取り付けられているモジュールを自動的に検出して正しい設定を適用するので、経験の浅いユーザーでも数秒でモジュールを交換できます。

本研究では、DialPath モジュールを付きの Cary 630 FTIR エンジンを用いて、市販の消泡剤中のシメチコンを定量しました。比較のために、透過型サンプルコンパートメント内で取り外し可能なセルを使用する従来の FTIR アプローチも使用してデータを取得しました。シメチコンの定量は、USP-NF モノグラフ、USP43-NF38、4044 ページ (1) に記載されています。このモノグラフに従って、製剤中のシメチコンの量は、2 mg/mL のシメチコン標準溶液 (2 mg/mL が 100 % パーセント濃度に相当) と比較したサンプルのパーセント濃度として測定します。

実験方法

ブランク、標準、およびコントロールのサンプル溶液の調製

USP43-NF38 は、既知のシメチコン標準に対するパーセント濃度としてのシメチコンの定量について説明しています。2 mg/mL (100 % 濃度相当) のシメチコンを含むシメチコン標準溶液は、シメチコン USP (米国薬局方) 参照標準を使用して調製しました。約 25 mg のシメチコン USP (CAS 8050-81-5) を正確に秤量し、50 mL のガラス製スクリーキャップ付き遠心分離チューブに移しました。12.5 mL の分光分析グレードのトルエンをチューブに加え、続いて 25 mL の 4.8 M HCl を加えました。チューブを 5 分間手で振とうした後、ボルテックスミキサーで 5 分間振とうしました。次にチューブを 1500 rpm で 30 分間遠心分離しました。上部有機層約 5 mL を、無水硫酸ナトリウム約 1 g を含む 50 mL のスクリーキャップ付き遠心分離チューブに移して、有機層に残っている水分をすべて除去しました。チューブを手で 1 分間激しく振とうし、透明な層が得られるまで 10 分間遠心分離しました。ブランクは、同じ手順に従って、ただしシメチコン USP を添加せずに調製しました。高濃度、低濃度、および濃度範囲内のサンプルを使用してメソッドをテストする目的で、濃度 81.2、114.0、および 100.7 % パーセント濃度のシメチコンを含む 3 つのコントロールサンプルも調製しました。

シメチコンを含むカプセルの調製

1 種類の市販シメチコンカプセルを地元の薬局から購入しました。ラベル表示によると、各カプセルに含まれているシメチコンは 100 mg です。各カプセルを 100 mL の 4.8 M HCl と 50 mL のトルエンに溶解して、公称濃度 2 mg/mL (100 % パーセント濃度) の溶液を調製しました。抽出は、シメチコン標準溶液について説明したものと同一手順に従いました。



図 2. 液体サンプルは、Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計に装着された DialPath モジュールのサンプルウィンドウに配置します。

装置構成

本研究では、2 台の Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計を使用しました。1 台目の Cary 630 FTIR は、フッ化カルシウムウィンドウと 500 ミクロンスペーサ (Omni-cell、Specac Ltd.、英国) 付きの従来型の取り外し可能な液体セル用に設計された透過モジュールが装着されたものです。2 台目の Cary 630 FTIR は、光路長 500 ミクロンの Agilent DialPath モジュールが装着されたものです (図 2)。

液体セルと DialPath モジュールを用いて 2 台の FTIR 分光光度計で並行して分析するために、サンプルを 2 つのロットに分割しました。サンプル間の残留物やキャリーオーバーを最小限に抑えるために、液体セルを大量のトルエンで洗浄しました。DialPath の 2 つのサンプルウィンドウは、イソプロパノールを数滴垂らした布で拭き取るだけできれいになりました。MicroLab ソフトウェアを使用して、データを収集しサンプル濃度を直接計算するメソッドを作成しました。サンプル溶媒の吸光度を補正するため、液体セルと DialPath のブランクに対してそれぞれバックグラウンドを測定しました。メソッドの条件を表 1 にまとめます。

表 1. 従来の液体セルと DialPath モジュールの 2 つを用いた定量測定に使用した FTIR のメソッド条件

パラメータ	設定
スペクトル範囲 (cm ⁻¹)	4000 ~ 650
バックグラウンドのスキャン回数	64
サンプルのスキャン回数	64
スペクトル分離能 (cm ⁻¹)	2
バックグラウンド収集	ブランクを使用
光路長 (ミクロン)	500*

*USP43-NF38 で指定

結果と考察

定量分析：従来の取り外し可能な透過型セルと DialPath との比較

シメチコンサンプルの定量分析は、2 台の Cary 630 FTIR 分光光度計を使用して実施しました。1 台は従来の取り外し可能な液体セルを備え、もう 1 台は DialPath モジュールを備えた装置です。定量には、約 1260cm⁻¹ におけるバンドの最大吸光度を使用しました。USP43-NF38 モノグラフに従い、標準およびサンプルの吸光度の値を使用して式 1 によりシメチコンのパーセント濃度が計算できます (1)。

式 1:

$$\text{パーセント濃度} = \frac{A_U}{A_S} \cdot \frac{C_S}{C_U} \cdot 100\%$$

詳細:

$$\text{パーセント濃度} = A_U \cdot \frac{1}{A_S} \cdot \frac{C_S}{C_U} \cdot 100\% \equiv A_U \cdot \left(\frac{1}{A_S} \cdot \frac{C_S}{C_U} \cdot 100\% \right)$$

≡ A_U · (乗算係数)

A_U = サンプル溶液の吸光度

A_S = 標準溶液の吸光度

C_S = 標準溶液中のシメチコンの濃度

C_U = サンプル溶液中のシメチコンの公称濃度

パーセント濃度の自動計算

MicroLab ソフトウェアは、分かりやすい画像が用いられ操作しやすい設計となっており、ユーザーは分析ワークフロー全体を通じてソフトウェアのガイドに従って操作することができます。DialPath および液体セルを使用したシメチコン溶液のルーチン分析用の FTIR メソッドは両方とも、MicroLab ソフトウェア用いて作成しました。作成したメソッドは、約 1260 cm⁻¹ おける最大吸光度を自動的に測定します (単一のベースラインコンポーネントでピーク高さを使用)。ソフトウェアは式 1 に従った計算を自動的に適用します (図 3 を参照)。

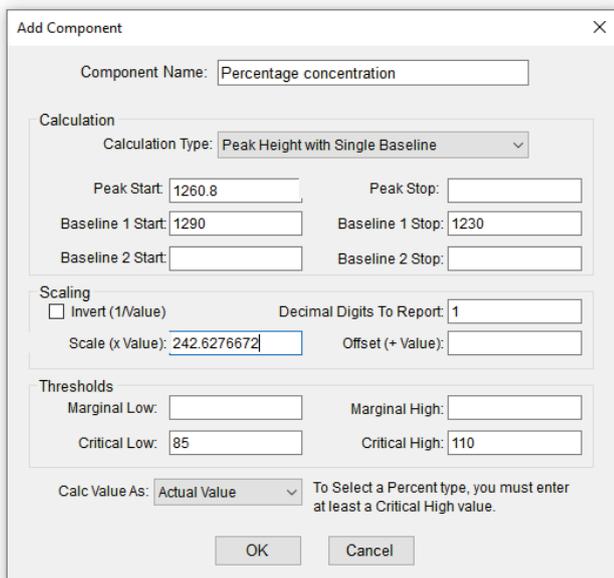


図 3. MicroLab ソフトウェアでは、「components」を使用して、測定されたスペクトルから定量的な結果が計算されます。上に示した component は、バンドの最大値、この例では約 1260.8 cm⁻¹での吸光度の値 (A_λ) を自動的に測定します。次に、スケール (x 値) が吸光度の値に乗算係数を適用して、最終結果を算出します。式 1 に示すように、パーセント濃度 = 吸光度の値 (A_λ) × 乗算係数です。本研究では、DialPath の乗算係数は 242.6276672 です。

サンプル中のシメチコンのパーセント濃度は、データ取得後直ちに報告されます。結果が USP 指定の許容基準である 85 ~ 110 % の範囲外である場合、結果に赤のフラグが付けられます。図 4 は、シメチコン濃度が 81.2 % であるコントロールサンプル 1 の例です。

表 2. DialPath 付きの Cary 630 FTIR および透過型セル付きの Cary 630 FTIR を使用して測定した 3 つのコントロールサンプル中のシメチコンのパーセント濃度

コントロールサンプル	シメチコンの理論上のパーセント濃度 (%)	DialPath 付きの Cary 630 FTIR		透過型セル付きの Cary 630 FTIR	
		測定したパーセント濃度 (%)	正確度 (%)	測定したパーセント濃度 (%)	正確度 (%)
1	81.2	81.2	100	80.3	98.8
2	114.0	113.1	99.2	111.1	97.4
3	100.7	102.6	98.1	103.1	97.7

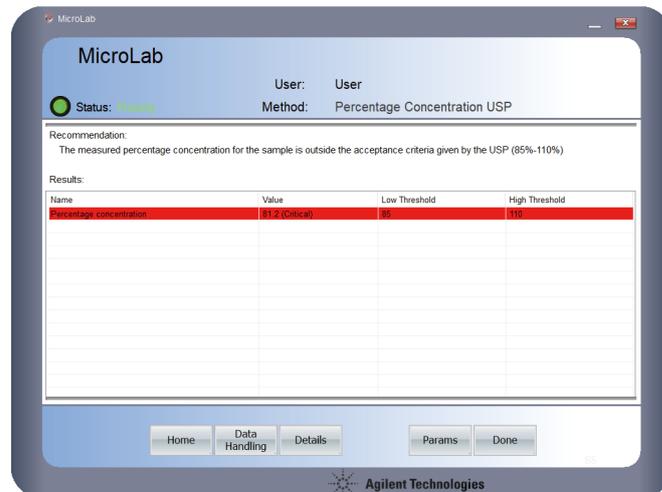


図 4. MicroLab ソフトウェアを使用して、コントロールサンプルと市販のカプセルのパーセント濃度を測定しました。メソッドのスレッショールド設定に従って、実用的な結果が色分けされて、データ取得の直後に報告されます。

液体セルと DialPath モジュールを使用して、コントロールサンプル 1、2、および 3 のパーセント濃度を、2 つの Cary 630 FTIR メソッドにより測定しました。表 2 の結果は、液体セルよりも DialPath アクセサリを使用した方がより正確な結果が得られたことを示しています。

DialPath 付きと液体セル付きの 2 台の Cary 630 FTIR で測定した市販カプセルに含まれるシメチコンのパーセンテージ濃度は、USP で指定されている 85.0 ~ 110.0 % の許容範囲内でした (表 3) (1)。この結果は、DialPath が USP (米国薬局方) 要件に従って液体製剤中のシメチコンのパーセント濃度を測定するための適切なサンプリング手法であることを示唆しています。

表 3. DialPath モジュール付きの FTIR と透過型セル付きの FTIR を使用して得られた市販のシメチコンカプセルのパーセント濃度

	DialPath を用いて測定したパーセント濃度 (%)	透過型セルを用いて測定したパーセント濃度 (%)
市販サンプル 1	101.3	103.8
市販サンプル 2	101.7	101.8
市販サンプル 3	102.4	102.6

DialPath モジュール付きの Cary 630 FTIR の性能を、正確度、精度、直線性、および濃度範囲の観点からも評価しました。

測定の正確度

DialPath の測定の正確度を検証するために、標準添加法テストを実施しました。正確な量の高濃度のシメチコン標準溶液を添加することにより、公称パーセント濃度が 97.3 % のシメチコンの 3 つの一定分量のサンプルに、5、10、および 15 % のシメチコンをスパイクしました。スパイクした各サンプルを 3 回測定し、次の式に従って平均回収率を計算しました。

$$\text{式 2: \% 回収率} = (C_1/C_2) \times 100$$

C_1 = 測定したパーセント濃度

C_2 = 計算したパーセント濃度

表 4 の回収率の結果はすべて 100.5 % 以内であり、DialPath モジュール付きの Cary 630 FTIR で非常に正確な測定が可能であることを示しています。

表 4. メソッドの精度を決定するために実施した、DialPath モジュール付きの Cary 630 FTIR を使用して 3 パーセント濃度でシメチコンをスパイクしたシメチコンサンプルの分析、n=3

サンプルのパーセント濃度 (%)	スパイクしたパーセント濃度 (%)	計算したパーセント濃度 (%)	測定したパーセント濃度 (%)	平均回収率 (%)
97.3	5.0	102.3	102.4	100.1 ± 0.2
97.3	10.0	107.3	107.8	100.5 ± 0.4
97.3	15.0	112.3	112.7	100.4 ± 0.1

測定精度

DialPath 測定を使用した Cary 630 FTIR の精度は、再現性の検査を実施することによって評価しました。シメチコン溶液を 6 つに分け、各サンプルを個別に分析しました。結果の再現性は、シメチコンの吸光度とパーセント濃度の平均と標準偏差を計算することによって評価しました (表 5)。DialPath モジュールを備えた Cary 630 FTIR は、標準偏差が吸光度に関してはわずか 0.0013 であり、濃度測定値の 0.34 % という優れた精度を示しました。

表 5. 同じサンプルの 6 回の測定による DialPath 付き Cary 630 FTIR の再現性の評価

	吸光度	サンプルのパーセント濃度 (%)
サンプル 1	0.4154	100.8
サンプル 2	0.4144	100.5
サンプル 3	0.4137	100.4
サンプル 4	0.4167	101.1
サンプル 5	0.4158	100.9
サンプル 6	0.4178	101.4
平均	0.4156	100.9
標準偏差	0.0013	0.34

検量線の直線性と濃度範囲

成分濃度と DialPath モジュールを使用した吸光度の読み取り値との間の直線性は、検量線を作成し、最小二乗法回帰を使用して曲線を評価することによって示しました。5 つの異なるシメチコン濃度の標準溶液は、適切に希釈して 0 ~ 190 % のパーセント濃度範囲で調製しました。シメチコンに対応するピーク高さ (1260.8 cm⁻¹) を使用して、DialPath のスペクトル応答の直線性を評価しました。これらの測定値を使用して検量線を取得し、検量線から相関係数 (R²) を計算しました。検量線の作成および統計計算にはすべて、MicroLab Quant ソフトウェアを使用しました。

濃度の関数としてシメチコンのピーク高さ (1260.8 cm⁻¹) をプロットすると、DialPath スペクトル応答の相関係数が R² = 0.9997 となり、優れた直線性を持っていることがわかりました (図 5)。

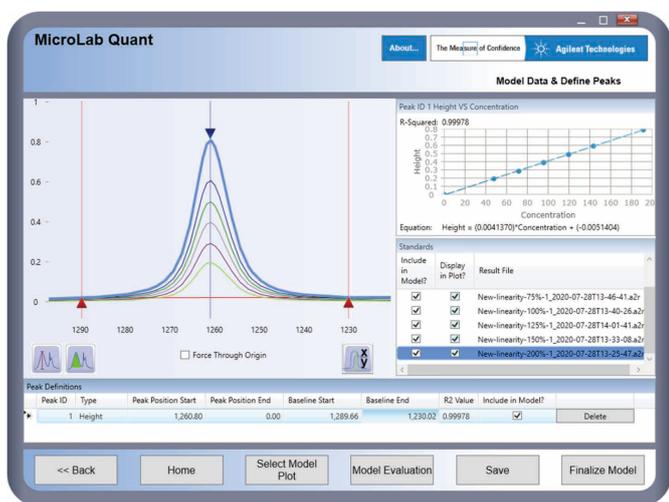


図 5. MicroLab Quant ソフトウェアによる DialPath の直線性評価。検量線と相関係数の計算は、ソフトウェアで自動的に実行されます。ユーザーは、取得した結果を文書化のために報告できます。

サンプルスルーputとリソースの使用

DialPath モジュール付きの Cary 630 FTIR によるシメチコンの定量は、液体透過型セルを使用した分析と比較して、サンプルスルーputを大幅に向上させ、サンプル量を最小限に抑え、溶媒の無駄を削減します (図 6 を参照)。

1 時間の分析時間で、DialPath は 40 個のサンプル抽出物を分析できました。これは液体セルの 2 倍のサンプル数です。データ取得時間は、両方のサンプリング手法とも約 1 分でした。さらに、DialPath で必要だったシメチコンサンプル溶液はわずか 20 μL ですが、液体セルでは各サンプル 5 mL 必要でした。

液体セルでは、キャリアオーバーを回避するために次のサンプルを注入する前に、複数回洗浄する必要があります。DialPath は、布と数滴の溶剤で洗浄できるため、溶剤の無駄を減らし、溶剤と廃棄物の処理にかかるコストを節約できます。また、DialPath は、液体透過型セルに伴う複雑さ (例えば、サンプル導入間の洗浄、気泡が閉じ込められていないことの確認、開口プレートの適切な取り扱い) を解消する簡単で使いやすいサンプリング手法です。DialPath を用いれば、サンプル、時間、およびコストが大幅に節約できます。

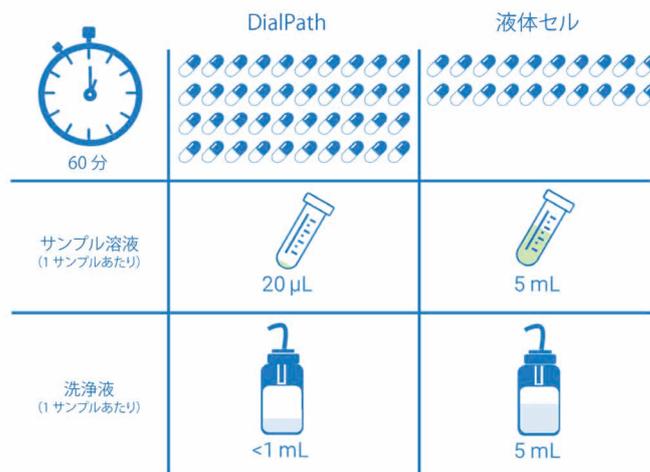


図 6. DialPath モジュール付きの Cary 630 FTIR および、従来型の液体透過型セル付きの Cary 630 FTIR を使用して、シメチコン抽出物を 60 分間分析した後の比較表

結論

本アプリケーションノートでは、高効率の透過型サンプリングアクセサリ (DialPath) 付きの Cary 630 FTIR を用いた液体医薬品サンプルの迅速な定量分析について紹介しました。

DialPath モジュールを装着した Agilent Cary 630 FTIR の性能、分析速度、革新的なサンプリングにより、シメチコンの測定の定量メソッドの迅速な開発と活用が可能になりました。

DialPath を使用した Cary 630 FTIR によって生成された定量データの品質は、従来のセルを使用した Cary 630 FTIR によって得られた結果と同等またはそれ以上でした。DialPath の使いやすさは、従来の液体セルを使う場合と比較して大幅な時間とコストの節約をもたらし、医薬品アプリケーションに最適です。

DialPath 付きの Cary630 FTIR では、再現性に優れ、最大 190 % のシメチコン濃度まで直線性が高いキャリブレーションが得られました。シメチコンの測定では分析データの優れた正確度と精度が得られ、機器、メソッド、および分析結果の有効性を実証することができました。

Cary 630 FTIR は、欧州、米国、インド、日本薬局方などの世界の薬局方の性能要件を満たしています。オプションの MicroLab 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を促進します。

参考文献

1. Simethicone Emulsion. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP43-NF38-4044) DocID: GUID-4965A93F-3617-485C-87B4-1DFBDF33EC3F_4_en-US.

ホームページ

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

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. 2021
Printed in Japan, April 14, 2021
5994-3046JAJP
DE44297.9470717593