

# 同一性試験の精度改善に向けた検証 ベースライン補正の効果

## Verification to improve the accuracy of identity test Effect of baseline correction

### 実験の目的

2014年5月に日本のPIC/S加盟は承認されたことから、PIC/Sが要求する製剤に使用される全ての医薬品原料に対して確認試験の運用が検討され<sup>(1)</sup>さらに2019年に第十七改正日本薬局方第二追補にラマンスペクトル測定法として記載されるなど益々ラマン分光法への期待が高まり、原薬の結晶形の評価<sup>(2)</sup>や晶析反応<sup>(3)</sup>などの研究開発から製剤中の有効成分の含量均一性評価<sup>(4)</sup>や原料受入れ試験などの品質管理<sup>(5)</sup>まで広く利用される分析手法となっている。広く利用されるようになり、セルロースや生薬原料など蛍光発光を有する物質のスペクトルが傾斜するなどの問題<sup>(6)</sup>も明らかになってきた。

近年、医薬品の不正製造事例が明らかになり<sup>(7)</sup>、試験検査方法の科学的検証や人為的誤りの最小化<sup>(8)</sup>などの医薬品の品質管理に対する姿勢が問われるようになってきた。

そこで、蛍光発光を有する結晶セルロースをモデル原料とし、携帯型ラマン分光計を用いて判別モデルを構築し、判別モデルや試験結果のばらつきを科学的に検証した結果を報告する。

### 実験に用いた試料および装置

標準スペクトル測定と判別モデル構築には励起レーザー波長が785nmを搭載した携帯型ラマン装置MIRA P (Metrohm AG Herisau/Switzerland)を用いた。(Fig. 1)本装置は、わずか705gで、FDA21 CFR Part 11に準拠し、医薬品や化学品の原料受け入れ確認試験に用いられている。装置の主な性能と仕様をTable 1に示す。



Fig. 1

装置の主な性能・仕様	
励起レーザー波長	785 ± 0.5nm
測定可能領域	400 ~ 2300 cm <sup>-1</sup>
スペクトル分解能	8 ~ 10 cm <sup>-1</sup>
測定時間 (最大)	20秒
レーザー出力 (最大)	100mW
重さ	705g
サイズ (H x W x D)	126 x 88.4 x 44.8 (mm)
検出器	CCDアレイ
検出器	1024 X 64 ビットセル
バッテリー	単三バッテリー 2本
動作温度範囲	-20 ~ 50℃

Table 1

### 測定条件および解析

標準試料と判別モデル構築用試料として、結晶セルロース (UF-702 旭化成) と HPMC (信越化学) をそれぞれポリエチレン (厚み 20 μm 二重) に入れ、風袋の外から測定を実施した。(Fig. 2)標準スペクトル測定はレーザー強度5、積算回数は1回とし、判別モデル用測定はレーザー強度5、露光時間はAuto、そして積算回数は1回を採用した。なお、すべての試料は脱着可能な単焦点レンズを装置に搭載し測定を行った。判別モデル構築にMIRA Cal P (Metrohm AG Herisau/Switzerland) を使用し、標準装備されているPCA (主成分分析: Principal Component Analysis) を使って判別モデルを構築した。判別モデルを寄与率、Loading Plot、Hotelling T<sup>2</sup>などの機能を使って科学的検証を加え、p値を使って判別モデルの繰り返し精度のバリデーションも実施した。



結晶セルロース (MC)



ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC)

Fig. 2

### 結果と考察

#### ①類縁物質の測定

Fig. 3にHPMCと結晶セルロース (MC) のラマンスペクトルを測定した結果を示す。主骨格であるセルロースから蛍光発光が生じ、ラマン散乱のピークに重複することで試料由来のピークを不明瞭にしたと考えられる<sup>(9)</sup> HPMCとMCのラマンスペクトルの850~1500cm<sup>-1</sup>の領域においてHPMCには1119, 1152, 1366そして1452cm<sup>-1</sup>に特異的なピークを確認し、MCには1093, 1120, 1355そして1378cm<sup>-1</sup>などに特異的ないくつかのピークを確認した。<sup>(10)</sup>

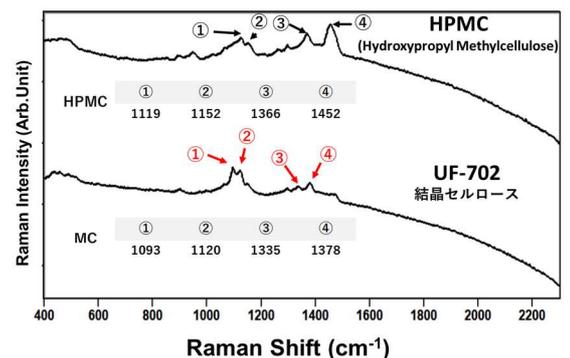


Fig. 3

#### ②判別モデルの検証

Fig. 4 (a)にベースライン補正を行っていないMCのスペクトルを示し、Fig. 4 (b)にベースライン補正後の同ラマンスペクトルを示す。またFig. 4 (c)にPCAから得られた第一主成分 (PC1) のラマンスペクトル (ローディングプロット) を示す。ベースライン補正後のスペクトルはMCに特異的なピーク (①~④) が補正前のピークと比較して明瞭になった。主成分 (PC1) スペクトルは補正後のスペクトルとピーク位置と強度が酷似していることからベースライン補正後の判別モデルの第一主成分はMCであることが示唆された。<sup>(11)</sup>

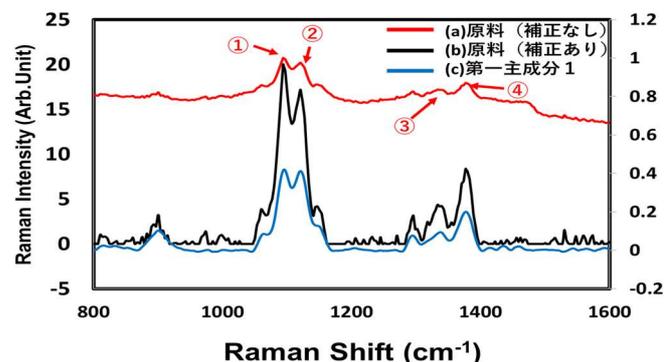


Fig. 4

### ③寄与率

PCA (Principle Component Analysis) とは、相関のある多数の変数から相関のない少数で全体のばらつきを最もよく表す主成分と呼ばれる変数を合成する多変量解析の1つで、PLSやMCRと並んで医薬品の有効成分の結晶多形の識別や晶析反応解析、工程管理に広く利用されている統計解析の1つである。(12) PCA解析から得られた主成分はローディングプロット>Loading Plot)として表すことができる。(13)

(Fig. 5) Fig. 6に本主成分分析結果から得られた寄与率を示す。PC1の寄与率は84.7, PC2は2.091となった。(Table 2)主成分1~10の累積寄与率は94.216となった。(非表示) 残差は装置が本来有するノイズや測定誤差などと解釈され(13), 本実験から得られた累積寄与率は100%に近く、データの散らばり度合いを説明できている割合が高いことを表している。

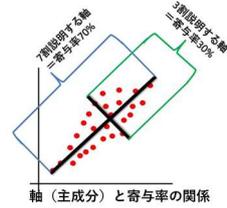


Fig. 5

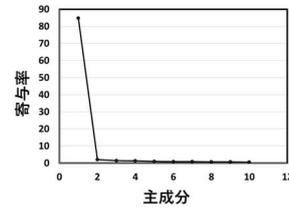


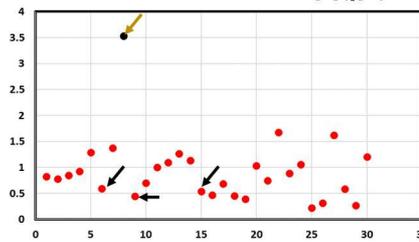
Fig. 6

成分	寄与率
1	84.78
2	2.091
3	1.385
4	1.346
5	1.014
6	0.904
7	0.781
8	0.67
9	0.66
10	0.587

Table 2

### ④ホテリングT<sup>2</sup>プロット

PCA結果の1つにホテリングT<sup>2</sup> (Hotelling) プロットを使って潜在的な外れ値(誤判定)の識別を可視的に可能とした結果をFig. 7に示す。正常値(朱●)と外れ値(黒●)で示している。(14)潜在的な外れ値の識別は本実験では95%の信頼度を採用して計算した。外れ値となるスペクトルのみに1800cm<sup>-1</sup>付近(茶矢印)ピークがあることがわかる。1800cm<sup>-1</sup>付近にピークを持つ官能基は結晶セルロースになく、蛍光発光や電気ノイズなど外的要因が原因と考えられた。(Fig. 8)



サンプル番号

Fig. 7

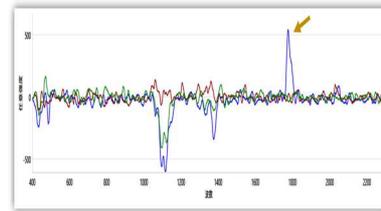


Fig. 8

### ⑤試験結果のばらつき (バリデーション)

MCの2種類の判別モデル(補正あり, なし)を使ってMCの同一性試験を行った結果をTable 3に示す。補正なしの判別モデルを使った場合に、18回試験中に7回の誤判定となったが、補正ありの判別モデルを使えば誤判定はなかった。判定の閾値をp≥0.05とした。繰返しの測定結果のばらつきは補正ありの場合、0.12になり、補正なしの場合には0.26となり、補正により繰返しの試験結果の精度が改善されたことが分かった。(Table 4)

p値比較 (測定値)	ベースライン補正 (あり/なし)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
補正あり	0.872	0.803	0.808	0.753	0.801	0.726	0.645	0.693	0.88
補正無し	0.084	0.758	0.11	0.736	0.353	0.229	0	0.085	0.141
							誤判定		
p値比較 (標準偏差)	ベースライン補正 (あり/なし)								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
補正あり	0.525	0.637	0.633	0.622	0.543	0.557	0.783	0.487	0.562
補正無し	0	0.022	0	0	0	0.044	0.696	0.179	0.374
	誤判定	誤判定	誤判定	誤判定	誤判定	誤判定			

Table 3

p値比較 (標準偏差)	
ベースライン補正 (あり/なし)	
補正あり	0.12
補正なし	0.26

Table 4

### まとめ

可視領域の励起レーザーを使った蛍光発光を有する原料の同一性試験は、ベースライン補正を施した判別モデルを採用することで誤判定を排除することが可能となった。主成分分析を用いて判別モデルを構築した。構築後の判別モデルはローディングプロットや寄与率さらにホテリングT<sup>2</sup>などを使えば、科学的検証が可能になり、判別モデルの評価や誤判定の原因を追究することが可能となった。

#### 【参考文献】

- (1) 久田浩史, 野上太郎, and 幸田史仁. "製剤機械等の紹介 ハンドヘルドラマン分光計における1064nm 励起の利点." 製剤機械技術学会誌= Journal of pharmaceutical machinery and engineering 24.4 (2015): 407-413.
- (2) Hisada, Hiroshi, et al. "Direct high-resolution imaging of crystalline components in pharmaceutical dosage forms using low-frequency Raman spectroscopy." Organic Process Research & Development 19.11 (2015): 1796-1798.
- (3) Inoue, Motoki, et al. "Real-time formation monitoring of cocrystals with different stoichiometries using probe-type low-frequency Raman spectroscopy." Industrial & Engineering Chemistry Research 56.44 (2017): 12693-12697.
- (4) Inoue, Motoki, et al. "Transmission low-frequency Raman spectroscopy for quantification of crystalline polymorphs in pharmaceutical tablets." Analytical chemistry 91.3 (2019): 1997-2003.

- (5) 久田浩史, et al. "日本薬局方の医薬品各条における確認試験を志向したラマン分光法の実用性." 製剤機械技術学会誌= Journal of pharmaceutical machinery and engineering 27.1 (2018): 5-12.
- (6) Kostamovaara, Juha, et al. "Fluorescence suppression in Raman spectroscopy using a time-gated CMOS SPAD." Optics express 21.25 (2013): 31632-31645.
- (7) 医薬品の不正製造事例の再発防止及び富山県の医薬品産業に対する信頼回復の方策についてのとりまとめ (2021)
- (8) 原薬の品質確保への取組み 厚生労働省 医薬・生活衛生局 (2016)
- (9) Gordon, Keith C., and Cushla M. McGovern. "Raman mapping of pharmaceuticals." International journal of pharmaceutics 417.1-2 (2011): 151-162.
- (10) De Veij, Marleen, et al. "Reference database of Raman spectra of pharmaceutical excipients." Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering 40.3 (2009): 297-307.
- (11) Inoue, Motoki, et al. "In situ monitoring of crystalline transformation of carbamazepine using probe-type low-frequency Raman spectroscopy." Organic Process Research & Development 21.2 (2017): 262-265.
- (12) Inoue, Motoki, et al. "Transmission low-frequency Raman spectroscopy for quantification of crystalline polymorphs in pharmaceutical tablets." Analytical chemistry 91.3 (2019): 1997-2003.
- (13) Rajalahti, Tarja, and Olav M. Kvalheim. "Multivariate data analysis in pharmaceutics: a tutorial review." International journal of pharmaceutics 417.1-2 (2011): 280-290.
- (14) Igne, Benoit, et al. "Modeling strategies for pharmaceutical blend monitoring and end-point determination by near-infrared spectroscopy." International journal of pharmaceutics 473.1-2 (2014): 219-231

### 【日本国内販売代理店】

デモ、価格などの詳細お問い合わせは  
株式会社テックアナリシス  
〒572-0020 大阪府寝屋川市田井西町1 8 - 1 0  
電話/FAX 072-380-6245

メールアドレス: hisada@tekanalysis.jp  
ホームページ: http://tekanalysis.jp/  
携帯電話番号: 090 4037 2065