



## 小容量溶出試験システム $\mu$ DISS におけるベースライン補正機能の検証

日本バリデーション・テクノロジーズ株式会社 技術統括部 CTO 武田 日出夫

### 背景

小容量溶出試験システム  $\mu$ DISS は、試料溶液中の紫外可視吸光スペクトルをリアルタイムで測定するシステムである。試料溶液中には、通常、賦形剤、添加剤、未溶解の医薬品原料などの不溶性粒子が存在するため、不溶性粒子が紫外可視吸光スペクトルに与える影響を最小化する必要がある。

本アプリケーションノートでは、 $\mu$ DISS システムを制御する AuPRO ソフトウェアが備えている未溶解の粒子の影響を補正する機能の検証を行うことを目的とした。

### ●AuPRO ソフトウェア

#### ベースライン補正方法の紹介●

AuPRO ソフトウェアは Point、Line、Scatter の 3 種類のベースライン補正方法を備えている。

「Point」は、測定波長の吸光度から、指定した波長の吸光度を差し引く補正方法であり、吸光度が測定領域で均一に増加している場合に有効な補正方法である。(図 1)

「Line」は、指定した 2 波長間の吸光度を用いてベースラインとなる直線を引き、測定波長での吸光度を差し引く方法である。吸光度が測定領域で直線的に(傾きをもって)増加している場合に有効な補正方法である。

「Scatter」は試験液中の微粒子の影響で紫外光の散乱現象が発生し、ベースラインの吸光度が指数関数的に変化している場合に有効な補正方法である。

さらに、吸光度二次微分値を用いた解析も可能である(図 2)。試料溶液に応じて最適な解析方法を用いることが重要である。

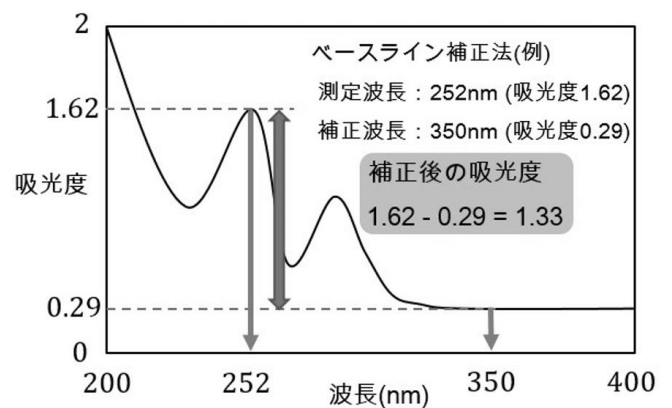


図 1 ベースライン補正方法の例 (Point)

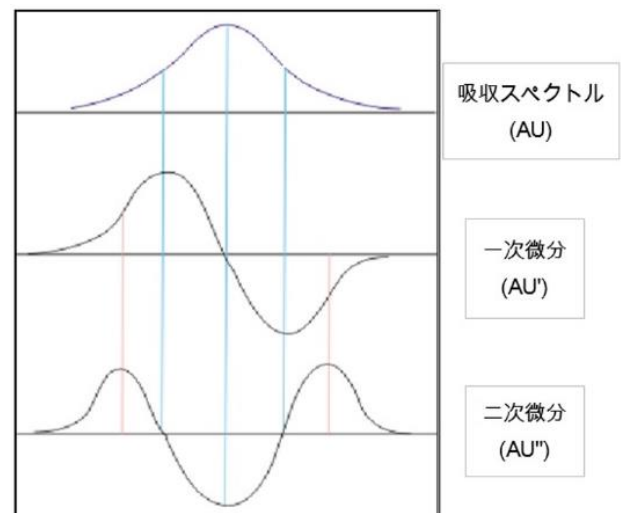


図 2 吸光度二次微分



### 検証① 不溶性粒子が紫外可視吸光スペクトルに与える影響の確認

#### 手順①

1.  $\mu$ DISS のポジション 1～8 の UV プローブに、2mm のプローブチップを取り付けた。
2.  $\mu$ DISS の各ポジションに 20mL の精製水を満たしたバイアルを設置した。
3. 300RPM に攪拌した状態で、精製水の 200～720nm での吸光スペクトルを 10 回取得した。
4. ポジション 2～8 のバイアルに 10～70mg の結晶セルロース(Avicel PH-101,  $\sim 50\mu\text{m}$  particle size, SIGMA-ALORICH)を添加し、300RPM で攪拌した状態で 200～720nm での吸光スペクトルを 10 回取得した。

#### 結果①

結晶セルロース存在下での紫外可視吸収スペクトル(10 回測定 of 平均値)を図 3 に示す。いずれの濃度においても全波長領域で吸光度が増加した。吸光度はいずれの場合も直線的に変化しているため、Point または Line ベースライン補正、または吸光度二次微分による解析が適切と考えられる。

### 検証② 不溶性粒子存在下でのカフェイン濃度測定

#### 手順②

1.  $\mu$ DISS のポジション 1～8 の UV プローブに、2mm のプローブチップを取り付けた。
2.  $\mu$ DISS の各ポジションに 10mL の精製水を満たしたバイアルを設置した。
3. 300RPM に攪拌した状態で、精製水の 200～720nm での吸光スペクトルを 10 回取得した。
4.  $\mu$ DISS の各ポジションに 10mL のカフェイン溶液を添加した。(添加後の各ポジションのカフェイン濃度：約  $102\mu\text{g}/\text{mL}$ )
5. 300RPM に攪拌した状態で、カフェイン溶液の 200～720nm での吸光スペクトルを 10 回取得した。
6. ポジション 2～8 のバイアルに 10～70mg の結晶セルロースを添加し、300RPM で攪拌した状態で 200～720nm での吸光スペクトルを 10 回取得した。

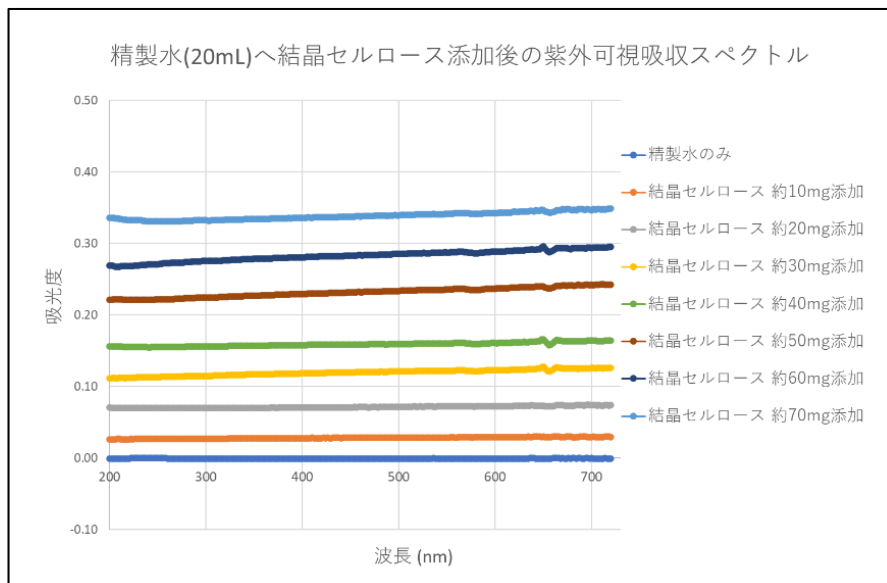


図 3 結晶セルロース存在下での UV-Vis 吸収スペクトル



結果②

図 4 に結晶セルロース 70mg 添加前後の吸収スペクトル、図 5 に計算された(見かけの)カフェイン濃度を示す。結晶セルロースの添加により、全波長領域で吸光度の増加が確認できた。吸光度の増加に伴い、見かけのカフェイン濃度も増加した。

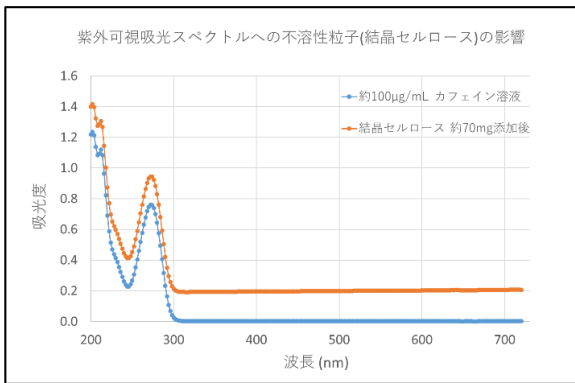


図 4 結晶セルロース添加前後での紫外可視吸収スペクトル

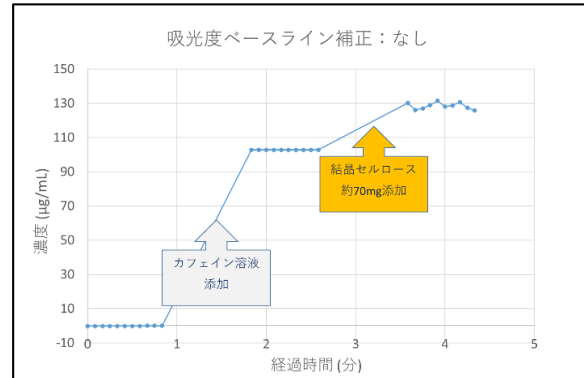


図 5 (見かけの)カフェイン濃度

得られた吸収スペクトルに対し、Point(400nm)、Line(400nm)によるベースライン補正、吸光度二次微分による解析を行い、濃度計算を行った。

ベースライン補正を実施した場合、いずれの補正方法においても、カフェイン濃度への影響は±1%以内に抑えることができ、データのばらつきも改善した。結果を表 1 に示す。

表 1 結晶セルロース存在下でのカフェイン濃度測定結果

| ベースライン補正：無し        |                 | Caffeineのみ    |       | 結晶セルロース添加後    |       |
|--------------------|-----------------|---------------|-------|---------------|-------|
| 吸光度計算範囲 270~278 nm |                 |               |       |               |       |
| 測定ポジション            | 結晶セルロース添加量 (mg) | 濃度計算値 (µg/mL) | SD    | 濃度計算値 (µg/mL) | SD    |
| 1                  | 0               | 102.42        | 0.212 | 102.55        | 0.745 |
| 2                  | 10              | 102.44        | 0.009 | 106.35        | 0.602 |
| 3                  | 20              | 102.21        | 0.022 | 110.27        | 0.808 |
| 4                  | 30              | 102.99        | 0.043 | 113.66        | 1.078 |
| 5                  | 40              | 102.41        | 0.036 | 119.21        | 1.924 |
| 6                  | 50              | 102.57        | 0.032 | 124.49        | 3.052 |
| 7                  | 60              | 102.86        | 0.023 | 125.51        | 1.924 |
| 8                  | 70              | 102.75        | 0.020 | 128.38        | 1.910 |

| ベースライン補正：Point (400 nm) |                 | Caffeineのみ    |       | 結晶セルロース添加後    |       |
|-------------------------|-----------------|---------------|-------|---------------|-------|
| 吸光度計算範囲 270~278 nm      |                 |               |       |               |       |
| 測定ポジション                 | 結晶セルロース添加量 (mg) | 濃度計算値 (µg/mL) | SD    | 濃度計算値 (µg/mL) | SD    |
| 1                       | 0               | 102.56        | 0.041 | 102.37        | 0.079 |
| 2                       | 10              | 102.35        | 0.014 | 102.15        | 0.130 |
| 3                       | 20              | 102.09        | 0.020 | 101.69        | 0.096 |
| 4                       | 30              | 103.08        | 0.045 | 102.56        | 0.172 |
| 5                       | 40              | 102.52        | 0.022 | 101.83        | 0.126 |
| 6                       | 50              | 102.91        | 0.021 | 102.30        | 0.169 |
| 7                       | 60              | 103.04        | 0.025 | 102.33        | 0.141 |
| 8                       | 70              | 102.59        | 0.018 | 101.37        | 0.352 |





表 1 結晶セルロース存在下でのカフェイン濃度測定結果(続き)

| ベースライン補正：Line (400 ~ 440 nm) |                 | Caffeineのみ    |       | 結晶セルロース添加後    |       |
|------------------------------|-----------------|---------------|-------|---------------|-------|
| 吸光度計算範囲 270~278 nm           |                 |               |       |               |       |
| 測定ポジション                      | 結晶セルロース添加量 (mg) | 濃度計算値 (µg/mL) | SD    | 濃度計算値 (µg/mL) | SD    |
| 1                            | 0               | 102.68        | 0.039 | 102.57        | 0.065 |
| 2                            | 10              | 102.41        | 0.050 | 102.25        | 0.114 |
| 3                            | 20              | 102.25        | 0.039 | 102.08        | 0.119 |
| 4                            | 30              | 103.19        | 0.039 | 102.98        | 0.194 |
| 5                            | 40              | 102.56        | 0.035 | 102.25        | 0.320 |
| 6                            | 50              | 102.91        | 0.042 | 102.58        | 0.358 |
| 7                            | 60              | 103.26        | 0.029 | 103.02        | 0.124 |
| 8                            | 70              | 102.78        | 0.041 | 102.42        | 0.187 |

| 吸光度二次微分            |                 | Caffeineのみ    |       | 結晶セルロース添加後    |       |
|--------------------|-----------------|---------------|-------|---------------|-------|
| 吸光度計算範囲 270~278 nm |                 |               |       |               |       |
| 測定ポジション            | 結晶セルロース添加量 (mg) | 濃度計算値 (µg/mL) | SD    | 濃度計算値 (µg/mL) | SD    |
| 1                  | 0               | 102.25        | 0.113 | 102.30        | 0.099 |
| 2                  | 10              | 102.30        | 0.075 | 102.25        | 0.076 |
| 3                  | 20              | 101.92        | 0.068 | 101.64        | 0.090 |
| 4                  | 30              | 103.01        | 0.070 | 102.81        | 0.123 |
| 5                  | 40              | 102.49        | 0.055 | 102.22        | 0.149 |
| 6                  | 50              | 102.69        | 0.096 | 102.18        | 0.141 |
| 7                  | 60              | 103.20        | 0.072 | 102.94        | 0.096 |
| 8                  | 70              | 102.64        | 0.051 | 102.32        | 0.130 |

吸光度二次微分値を用いた場合、結晶セルロースによる影響はほぼ現れなかった(図 6、図 7)。結晶セルロースによる吸光度の増加は波長に対して直線的であったため、微分操作を 2 回繰り返すことで打ち消すことができたと考えられる。

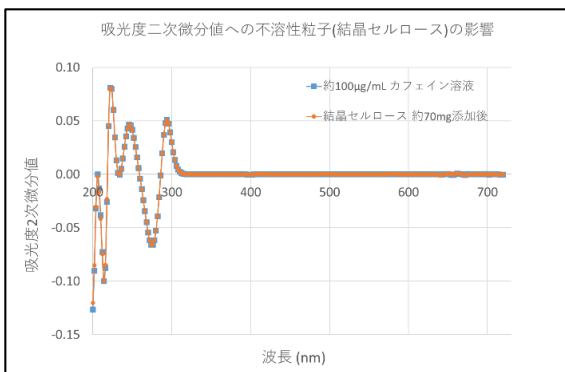


図 6 結晶セルロース添加前後での紫外可視吸収スペクトル二次微分値

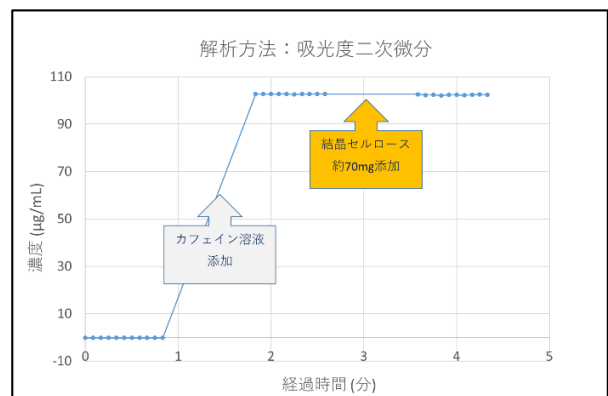


図 7 吸光度二次微分値を用いて計算されたカフェイン濃度



### 結論

本アプリケーションノートでは、20mL の試験液に対して最大で 70mg の結晶セルロースの添加を行った。一般的な溶出試験での試験液量(900mL)に換算すると、3g 以上に相当する濃度である。いずれの濃度の結晶セルロース存在下においても、吸光度は全波長領域で直線的に増加した。カフェイン溶液を用いた検証により、本条件下では AuPRO

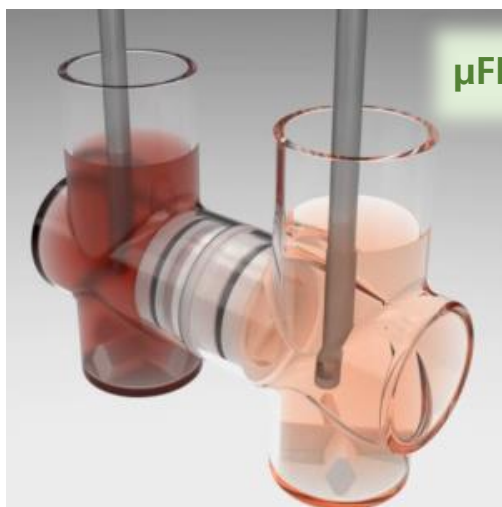
のベースライン補正機能「Point」、「Line」のいずれを用いても適切に濃度計算が実施できることを確認できた。また、吸光度二次微分を用いた場合でも適切に解析を実施することができた。

本試験結果から、AuPRO が備えているベースライン補正機能、吸光度二次微分機能は、懸濁した試験液の測定に十分に適していると考えられる。

## Pion Rainbow System 紹介



μDISS Profiler



μFLUX System



Macro/Bio FLUX System

