

令和2年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告

ラマン分光法を用いた医薬品の試験法におけるシステム適合性の導入に関する研究*²

小出 達夫*^{1, #}

Study on System Suitability for Pharmaceutical Quantification Test Using Raman Spectroscopy

Tatsuo KOIDE *^{1, #}

Summary

The purpose of this study was to investigate system suitability requirements for pharmaceutical quantification tests using Raman spectroscopy. Successive daily measurements showed that changes in Raman peak position caused by day-to-day variations in the condition of the instrument had a significant effect on the determined quantitative values. Therefore, it is necessary to specify that the spectrum of the substance to be tested should be confirmed to ensure system suitability. It is also necessary to specify the reproducibility of the scattering peak intensity in the spectrum, though in most cases the variation of the intensity is considered to be reduced by spectral pre-treatment and multivariate analysis. However, in the case of univariate analysis, it is necessary to set a stricter specification to take account of the effect of noise on the measured peak intensity. Appropriate management of samples for system suitability evaluation is also considered to be important.

Key words

Raman spectroscopy, System suitability, Transmission, Quantification

1 緒言

ラマン分光法は、単波長の光を測定試料に照射した際に発生する散乱光を分光して得られるレイリー散乱光とは異なる波長のラマン散乱光を解析する振動分光法であり、赤外分光法と同じく光を照射することによって生じる分子振動等のエネルギー変化を測定している分析法である。化合物の同定や結晶多形の判別などが迅速にできることから、近年では医薬品原料の受入時の確認試験に汎用されており、ま

た製剤中の主薬の定量への実用化も始まっている。特にPAT (Process Analytical Technology) 及びそれを用いたRTRT (Real Time Release Testing: リアルタイムリリース試験) に用いる分析技術として、一般的な生産のみならず近年導入の検討が進む医薬品連続生産の製造管理のために導入が検討されるなど¹⁾、医薬品の品質管理のための分析法として重要性が増しており、日本薬局方にも第十七改正第二追補より一般試験法として収載されている。

ラマン分光法を医薬品品質試験法、特に定量法と

* 1 国立医薬品食品衛生研究所薬品部 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26 (〒210-9501)

Division of Drugs, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan

* 2 本研究は一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団の令和2年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」事業により行ったものである。

責任著者 Corresponding author

して用いる場合には、医薬品に使われる化合物の物性、温度、湿度などの外部環境や機器のコンディションなどが影響し、定量結果に日間差が生じることが既に報告されている²⁾。そのため試験結果の信頼性を確保するためには、分析システムの稼働状態を日常的に確認するシステム適合性試験を導入する必要性が指摘されている^{3,4)}。システム適合性は、機器分析法による規格試験では不可欠な規定であり、一般的な定量法である液体クロマトグラフィーでは、システムの性能（試験対象物質を特異的に分析しうることを確認）、システムの再現性（繰り返し注入におけるばらつきの程度の確認）、検出の確認（限度値レベルでのレスポンスの数値的信頼性の確認）などを行う必要があることが日本薬局方の参考情報「システム適合性」に記載されている。しかしラマン分光法は液体クロマトグラフィーとは原理の異なる試験であり、またケモメトリックスなどが使われる可能性が高いことから、従来の液体クロマトグラフィーで用いられているシステム適合性をそのまま適用することは難しい。更に日本薬局方「2.26 ラマンスペクトル測定法」には分析法としての一般的な記述があるのみで、システム適合性に関する記述はない。海外薬局方においてもこれらの参考になる記述はないことから、局方においてラマン分光法におけるシステム適合性のあり方については早急に検討が必要であると考えられる。

本研究では上記の状況を踏まえ、ラマン分光法を用いた医薬品の試験法、特に定量法として用いる場合におけるシステム適合性について検討を行った。日本薬局方の参考情報「システム適合性」や、現在存在するPAT関連のガイドライン等を参考に、需要が増加しているラマン分光法における適正な試験の遂行のためのデータ収集及びラマン分光法のためのシステム適合性のあり方について検討を行った。

2 実験の部

2.1 試料

アセトアミノフェンは岩城製薬(株)、乳糖一水和物は富士フィルム和光純薬(株)から入手したものをを用いた。

2.2 測定用試料の作製

製剤モデルとして、アセトアミノフェン(20%)と乳糖一水和物(80%)を混合した錠剤を用いた。錠剤は、混合のみによる直打法により作製した。錠剤は重量300mg、20MPa、1分間の条件で圧縮形成し作製した。検量モデルを作成するため、アセトアミノフェンの含有量20%を表示量として、その60、80、100、120及び140%となる5水準の含量の錠剤を各10錠、計50錠を作製した。

2.3 試料錠剤の測定及び定量

透過型のラマン分光器を用いて、各含量水準につき10錠のラマンスペクトルを測定した。得られた各10錠のデータを半分に分けて一方を検量モデル作成に用い、残りの5錠のデータを用いてバリデーションを行った。得られたスペクトルは前処理としてBaseline subtraction及びStandard Normal Variate (SNV)を行った。検量モデルの作成には部分的最小二乗回帰(Partial Least Squares Regression; PLSR)又は1560 cm^{-1} 付近のピークを用いた単変量解析を用いた。測定は日を変えて計3回、繰り返し測定し、初日に作成した検量モデル及びそれぞれの日に作成した検量モデル両方を用いて定量を行った。

2.4 ラマンスペクトルの測定条件

ラマンスペクトル測定には測定ユニットを装備したRaman Workstation (Kaiser Optical systems, Inc.)を用いた。測定は励起波長785nm、波数範囲300~1800 cm^{-1} 、積算回数1回、露光時間10秒、スポットサイズは約1mmで行った。得られたスペクトルはデータ解析ソフトISys 5.0 (Malvern Instruments, Ltd.)及びGrams/AI8.00 software (Thermo Fisher Scientific, Inc.)を用いて解析を行った。

3 結果及び考察

3.1 PATを用いた試験法のシステム適合性の事例

日本薬局方においてシステム適合性とは、「試験法の適用時に目的に合う試験結果を与えることが検証された分析システムが、実際に品質試験を行う際にも適切な状態を維持していることを確認するための試験方法と適合要件について規定したものであ

り、通常、一連の品質試験ごとに適合性を確認するための試験が行われる」と記述されている。一般的な液体クロマトグラフィーによる定量法では、特異性の確認のためのシステムの性能、ばらつきの程度の確認のためのシステムの再現性が行われていることから、ラマン分光法を用いた定量法でもこれと同等のものが必要と考えられる。

分光法をツールとして用いたPATによるRTRTにおける定量法のシステム適合性試験について記述しているガイドライン等は現状のところあまり見当たらないが、医薬品承認申請のモデルとして作成された通称サクラ錠⁵⁾及びサクラ開花錠Mock⁶⁾において近赤外分光法を用いたRTRTの事例が示されている。そのシステム適合性の事例をTable 1に示す。両事例とも、含量既知の試料をシステム適合性評価用として用いる方法を採用している。両モックで異なる点は、サクラ開花錠において装置性能の管理に基づくシステム性能が入っている点である。ただし、装置性能の管理は試験の内容にかかわらず必ず行う性質のものであること、そしてシステムの性能は試験対象物質を特異的に分析しうることの確認であるため、校正用の標準物質よりも試験対象物質を用いた確認の方が好ましいと考えられる。システム適合性評価用の試料によるスペクトルの確認は結局のところ行うこと、また別途行う確認試験を同方法で行うなどによって、試験の手間を増やさずに対応は可能であることから、試験対象物質でシステム適合性試験を行うことは現実的な手段であると考えられる。その他の点は両Mockとも概ね考え方は同

様であると思われる。

上記の例は近赤外分光法の場合であるが、ラマン分光法を用いる場合でも基本的には同様と考える。ただし、近赤外分光法は一般的にブロードな吸収スペクトルを描くが、ラマン分光法のスペクトルは鋭い散乱ピークからなり、少しのピーク位置のずれが定量値に大きく影響するため、システム適合性試験の導入の必要性はより大きく、規格は厳密にすべきと考えられる。具体的な規格値は、米国薬局方のラマン分光法<858>のドラフトでは、分析バリデーションにおける再現性は2%以下とされていることから、これが当面の基準の参考となると思われるが、試験法によって状況は異なるため、最終的にはそれぞれの試験法における実測値から適切な値が規定されることになると思われる。

3.2 スペクトルの日間差と定量値への影響

一般的にラマン分光法のような分光学的手法が定量法において選択される場合は、連続生産等のようなケースでPATによるRTRTとして導入することが多いと想定される。そして定量法の場合は反射や後方散乱のような試料の限定された範囲だけを測定する手法ではなく、製剤の広い範囲を測定する透過法が選択されることが一般的であることから、本検討では透過型のラマン分光法を用いた検討を行った。

ラマン分光法の場合、スペクトルに日間差が出ることが明らかになっていることから、まずは日間差が定量値へ及ぼす影響について明確にするために、3日間にわたり3回繰り返し測定したデータについ

Table 1 Case Studies of System Suitability of Near-Infrared Spectroscopy

システムの性能		システムの再現性
サクラ錠	対照評価法により主薬配合量が約100%であることが確認された混合末を用い含量を測定するとき、表示量に対し98.0~102.0%である。	設定なし
サクラ開花錠	日本薬局方参考情報近赤外吸収スペクトル測定法「装置性能の管理」に従って、NIR装置が機能として有するシステムの性能テストを実施し、判定基準に適合する。	システム適合性評価用の素錠1個につきオンラインNIR法で10回測定する。得られたスペクトルにつき、検量モデルを用いて解析し、オンラインNIR法測定値を求めるとき、その回収率（オンラインNIR法測定値を通常試験法のHPLC測定値で除した値）のRSDは、2.0%以下である。システム適合性評価用の素錠は、通常試験法測定値が98.0~102.0%のロットを用いる。当該ロットの素錠を用いてシステムの適合性を評価する際は、あらかじめ求めた通常試験法のHPLC測定値を使って回収率を求める。

てスペクトルの違いと定量値の比較検討を行った。表示量を含む錠剤の3日間のスペクトルをFig. 1に、その60, 100, 140%を含む錠剤の1600 cm⁻¹付近の拡大スペクトルをFig. 2に示した。同日に測定した錠剤のスペクトルは含量が同じ場合、差はほとんど見られなかった。初日及び2日目では散乱ピークの位置に若干のずれが認められたものの、最大でも2 cm⁻¹以内でありほぼ同一のスペクトルであった。3日目に測定したスペクトルは、初日及び2日目のスペクトルと比較してピーク位置のずれが明確に確認された。3日目は測定波数範囲の中央付近では他の日とほぼ一致しているものの、スペクトルの端である1650 cm⁻¹付近のピークは約6 cm⁻¹のずれ

が認められた。錠剤の含量が異なってもこれらの傾向は同様だった (Fig. 2)。機器立ち上げ時の校正はシクロヘキサンを用いて毎日行ったが、分析機器のコンディションの影響など何らかの要因でこのような差が出る事が明らかとなった。以上のことから、機器の立ち上げ時に行われる機器の適格性の確認だけでは不十分であると考えられ、試験直前にシステム適合性試験を行う必要性が示唆された。

PLSRを用いて測定初日 (Day 1) に作成した検量モデルにより定量を行った結果をTable 2に示す。一般的にラマン分光法などを定量法として用いる場合は、製剤均一性試験に活用されるため、表示値 (20%) の60-140%の幅広い範囲の検量モデルを作成

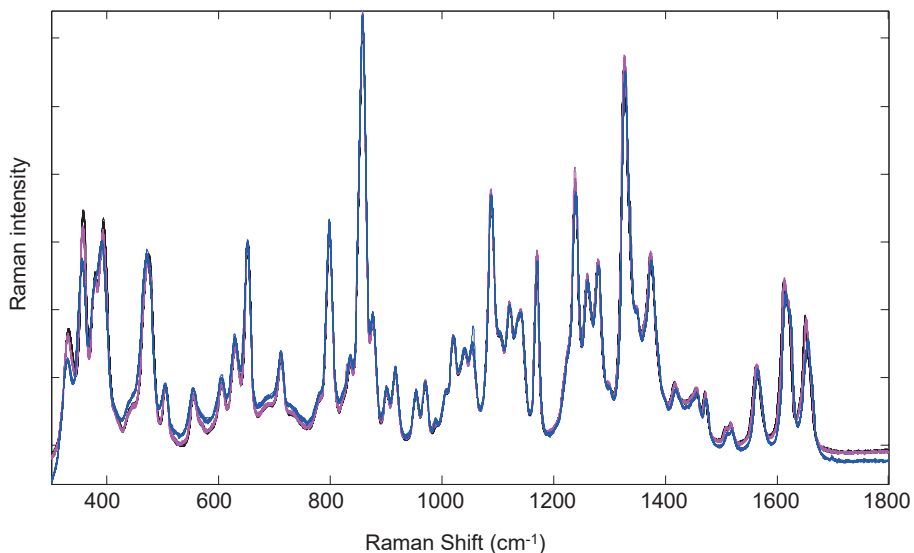


Fig. 1 Raman Spectra of the Tablets during the 3 Days
Black: first day, Magenta: second day, Blue: third day

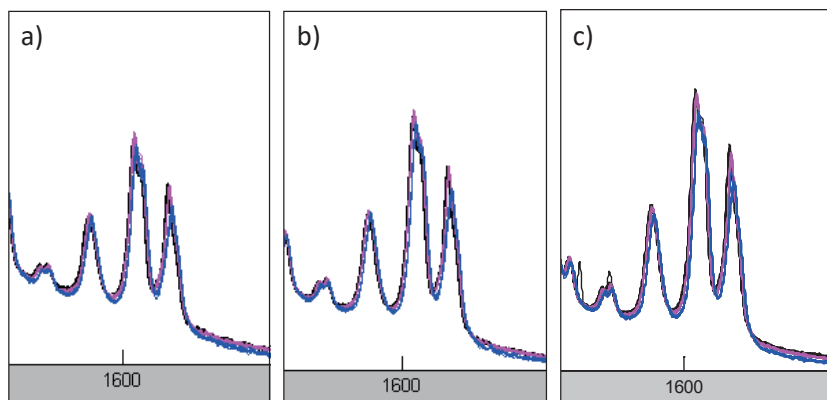


Fig. 2 Enlarged Raman Spectra of the Tablets during the 3 Days
a) 60%, b) 100%, c) 140%
Black: first day, Magenta: second day, Blue: third day

した。それぞれの含量で各5錠、計25錠の定量値はほぼ理論値を示したが、表示値から離れている140%の含量の錠剤は3日目にわずかに理論値からの乖離が見られた。初日 (Day 1) に作成した検量モデルを用いたDay 2, Day 3の定量値を初日 (Day 1) の定量値で除して5錠の平均値をとった結果及び、それぞれの測定日 (Day 2又はDay 3) に作成した検量モデルを用いたDay 2, Day 3の定量値を初日 (Day 1) の定量値で除して5錠の平均値をとった結果を比較した表をTable 3に示す。他の日に作成

Table 2 Intermediate Precision of Quantification for PLSR Using the Same Calibration Model in the First Day

Tablet No.	Theoretical value (%)	Day 1 (%)	Day 2 (%)	Day 3 (%)
60-1	60	62.4	61.3	62.9
60-2		59.8	60.5	60.3
60-3		60.8	60.1	60.9
60-4		58.5	59.0	60.1
60-5		58.2	59.8	59.1
80-1	80	78.5	78.5	80.0
80-2		79.6	78.5	79.6
80-3		77.7	79.3	79.8
80-4		78.2	78.0	80.6
80-5		79.6	79.8	79.0
100-1	100	99.8	99.6	100.8
100-2		100.3	102.4	100.8
100-3		100.1	99.8	100.0
100-4		101.8	102.2	100.6
100-5		101.0	101.3	100.9
120-1	120	121.0	120.6	118.5
120-2		121.4	120.8	119.8
120-3		121.8	121.9	120.0
120-4		120.5	121.2	118.3
120-5		119.9	119.8	118.7
140-1	140	140.3	138.0	135.5
140-2		139.0	136.1	135.0
140-3		138.8	137.6	134.0
140-4		138.8	137.0	135.7
140-5		138.4	137.1	134.7

した検量モデルではなく、それぞれの測定日に作成した検量モデルを用いると機器の要因等による日間差が抑えられることとなる。初日の検量線を用いた結果 (Day 2で98.6-100.5%, Day 3で97.1-101.4%) が、それぞれの測定日の検量モデルを用いることによりDay 2で99.4-100.5%, Day 3で98.6-100.0%と抑えられ、この差が測定日によってピーク位置がずれたことによる影響と考えられた。一方、同様に単変量を用いた結果をTable 4及びTable 5に示した。計25錠の定量値はPLSRを用いた時よりばらつきが大きく、表示値から離れた140%の含量の錠剤では定量値に更に大きな乖離が見られた。初日の検量線を用いた結果 (Day 2で97.3-103.8%, Day 3で92.1-104.2%) が、それぞれの測定日の検量線を用いることにより、Day 2で98.8-103.4%, Day 3で98.3-105.5%に大きく抑えられた。

Table 3 Effect on the Quantitative Values Using PLSR on the Date of Preparation of the Calibration Model

Tablet No.	Day 2/1 (%)	Day 2/1 (%)	Day 3/1 (%)	Day 3/1 (%)
	Day 1 ^{注)}	Day 2 ^{注)}	Day 1 ^{注)}	Day 3 ^{注)}
60-1~5	100.4	100.5	101.2	99.2
80-1~5	100.1	99.4	101.4	98.6
100-1~5	100.5	100.1	100.0	99.1
120-1~5	99.9	100.2	98.5	99.9
140-1~5	98.6	99.8	97.1	100.0

注) モデル作成日

上記の結果はシステム適合性を導入してはいるが、システム適合性を導入することによりスペクトルの日間差を管理することを行えば、他の日に作成した検量モデルであっても、それぞれの日に作成した検量モデルを用いた結果と同様になると思われる、適切な状態を維持した試験を行うことができる可能性が示唆された。初日、2日目程度の含量の差であれば日間差として容認できると考えると 2cm^{-1} 程度までがスペクトルの差として容認できると考えられる。更に、3日目は表示値周辺では理論値に近いことから、初日と3日目程度の含量の差を容認すると 5cm^{-1} 程度までがスペクトルの差として容認できる

Table 4 Intermediate Precision of Quantification for Univariate Method Using the Same Calibration Model in the First Day

Tablet No.	Theoretical value (%)	Day 1 (%)	Day 2 (%)	Day 3 (%)
60-1	60	60.2	62.5	62.6
60-2		57.6	59.6	57.2
60-3		57.1	60.4	62.1
60-4		60.7	58.8	63.2
60-5		59.1	64.4	61.9
80-1	80	81.2	77.3	83.2
80-2		79.2	81.7	85.1
80-3		80.5	82.7	81.6
80-4		80.9	83.0	81.9
80-5		83.2	79.8	79.7
100-1	100	98.4	100.4	98.7
100-2		95.5	102.1	100.2
100-3		101.0	104.5	101.4
100-4		101.4	102.6	102.9
100-5		101.8	103.2	99.6
120-1	120	119.9	119.6	110.9
120-2		122.5	120.9	115.6
120-3		123.0	120.9	115.8
120-4		122.8	119.7	114.1
120-5		118.0	118.0	115.7
140-1	140	141.7	137.6	127.4
140-2		140.3	133.7	126.7
140-3		140.5	138.0	129.2
140-4		136.8	134.0	130.1
140-5		140.2	137.4	130.8

と考えられる。多変量解析を用いる場合は広い測定波数範囲がモデルの対象のために日間差の影響は軽減されるが、選択されるケースは少ないと思われるが単変量により定量を行う場合はピーク位置のずれが定量結果に大きな影響を与えるため、厳密なシステム適合性を設定する、ずれが少ない部分のピークを選択するなどの工夫が必要であると考えられた。

3.3 スペクトルの強度と再現性

日内のスペクトル散乱強度の再現性に影響する要

Table 5 Effect on the quantitative values using univariate method on the date of preparation of the calibration model

Tablet No.	Day 2/1 (%)	Day 2/1 (%)	Day 3/1 (%)	Day 3/1 (%)
	Day 1 ^{注)}	Day 2 ^{注)}	Day 1 ^{注)}	Day 3 ^{注)}
60-1~5	103.8	100.3	104.2	102.2
80-1~5	99.9	98.8	101.7	104.0
100-1~5	103.0	103.4	101.0	105.5
120-1~5	98.8	100.0	94.4	99.8
140-1~5	97.3	99.0	92.1	98.3

注) モデル作成日

因を調査するために、表示量を含む一つの錠剤のみを短時間に複数回測定することを行った。6回測定した生スペクトルをFig. 3に示したが、1回目に測定したスペクトルはベースラインが高く、2回目以降は低下した。これはフォトリチングにより2回目以降の蛍光の発生が抑えられたのが原因と考えられた。これらはスペクトル前処理を行うことでほぼ同一のスペクトルとなった。昨年度の検討⁷⁾から、粒子径が小さくなるほど、また打錠圧が高いほど密度が高くなりラマン散乱が弱くなること、また、散乱強度が強いほど蛍光の影響によるベースラインの傾きが大きくなることが明らかとなっており、含有化合物の物性が再現性に影響する可能性が考えられた。しかし、物性の影響のほとんどは、蛍光によるベースラインの変動はスペクトルの前処理

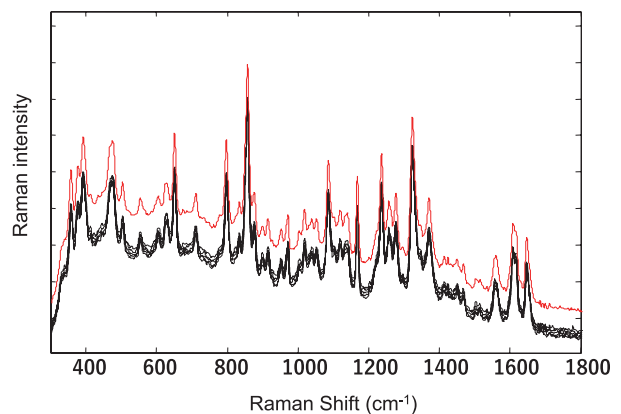


Fig. 3 Repeatability of Low Raman Spectra of the Tablets
Red: 1 time, Black: 2-6 times,

により除くことができたことから、物性の影響がスペクトルのノイズに現れた粒子径が小さい場合の影響のみについてSN比を計算してみた。結果は粒子径が38 μm 以下の小さい場合の最大ピークに対するSN比が5.4しかない一方、粒子径がそれ以上の場合には10をはるかに超えるSN比であった。粒子径が小さく、散乱が非常に弱い場合はノイズの影響を受けやすいため、十分なSN比が得られる条件で測定する必要があることから、例えば十分にSN比が得られる条件で試験法を作成するとともに、特異的なピークについてSN比が10以上のような規定を再現性に規定しておくことが考えられた。しかし、スペクトルの前処理を行うことにより強度自体は結果への影響が小さくなること、多変量解析を用いた場合、ノイズはほとんどが除去されることにより良好な結果が得られることから、あまり重要ではないかもしれないと考えられた。ただし単変量による解析の場合はノイズが再現性に直結するため、再現性を厳しく管理する必要がある。

3.4 システム適合性評価用の試料

PATを用いたRTRTのシステム適合性は、サクラ開錠等のMockが公開されたことにより、評価用の試料を用いる手法がこの先一般化されることになると思われる。そのためシステム適合性評価用の試料の適切な管理が必要になると考えられる。この試料は試験法が適切に運用されるための確認に用いることから、より試験対象の試料に近いものを用いる必要があり、試験対象試料と大きく異なる場合は様々な不具合が生じると考えられる。例えば透過型のラマン分光法ではスポットサイズによって錠剤の広い範囲を測定するが錠剤全体ではない一方、液体クロマトグラフィーは錠剤丸ごとを測定するため、混合性が悪い試料の場合はこの測定範囲の違いから対照評価法で測定した結果と異なる現象が起きる。安定性も重要で、保管中に分解した試料などでは正しい評価はできなくなる。これらのことを考えると、システム適合性用の試料は含量既知の前ロットの製品から比較的製造時期が新しいものを選択することが現実的と考えられる。

4 結論

本研究では、ラマン分光法を用いた医薬品試験法におけるシステム適合性の導入における検討を行った。スペクトルの日間差と定量結果を比較検討した結果、ピーク位置の変化が及ぼす定量値への影響が大きく、システム適合性において試験対象物質のスペクトルの確認を規定する必要があると考えられた。スペクトルの散乱ピーク強度の再現性も規定は必要と思われるが、多くはスペクトル前処理や多変量解析によりばらつきは軽減されると考えられる。しかし、単変量解析を用いる場合はより厳密な規格の設定が必要と考えられた。システム適合性評価用の試料の適切な管理も、システム適合性の導入において重要であると考えられる。今回の検討では一部の限定された事例を扱ったのみなので、適切なシステム適合性の導入については引き続き検討の必要があると思われる。このようにラマン分光法等、分析技術の新規導入を図るにあたり様々な課題が発生することから、局方における対応の研究の重要性は今後とも増すものと考えている。

文献

- 1) 小出達夫. ラマン分光法を用いた製剤の定量分析. 製剤機械技術学会誌. 2020, 29 (4), p.422-426.
- 2) Shimamura, R.; Koide, T.; Hisada, H.; Inoue, M.; Fukami, T.; Katori, N.; Goda, Y. Pharmaceutical quantification with univariate analysis using transmission Raman spectroscopy. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2019, 45 (9), p.1430-1436.
- 3) Andrews, D.; Geentjens, K.; Igne, B.; McGeorge, G.; Owen, A.; Pedge, N.; Villaumie, J.; Woodward, V. Analytical method development using transmission Raman spectroscopy for pharmaceutical assays and compliance with regulatory guidelines—Part I: transmission Raman spectroscopy and method development. *J. Pharm. Innov.* 2018, 13 (2), p.121-132.
- 4) Villaumie, J.; Andrews, D.; Geentjens, K.; Igne, B.; McGeorge, G.; Owen, A.; Pedge, N.; Woodward, V. Analytical Method Development Using Transmission Raman Spectroscopy for Pharmaceutical Assays and Compliance with Regulatory Guidelines—Part II: Practical Implementation Considerations. *J. Pharm. Innov.* 2019, 14 (3), p.245-258.
- 5) 平成20年度, 厚生労働科学研究, 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業, 医薬品製造開

- 発・承認審査の迅速かつ効率的なプロセス構築に関する研究「承認申請書，製剤製造方法，規格及び試験方法欄のモックアップ（記載例）」]. <http://www.nihs.go.jp/drug/section3/mock%20App.pdf>, (accessed 2021-10-29).
- 6) 平成28年度，国立研究開発法人日本医療研究開発機構，医薬品等規制調和・評価研究事業，医薬品の新規開発と製造変更における品質管理手法に関する研究「サクラ開花錠 承認申請書 製剤製造方法，規格及び試験方法欄のモックアップ（記載例）」]. <http://www.nihs.go.jp/drug/section3/SakuraBAFMock.pdf>, (accessed 2021-10-29).
- 7) 小出達夫. 平成31年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告，ラマン分光法を用いた医薬品の試験法開発と分析バリデーションに関する研究. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2021, 52 (3), p.214-220.