

Application Note

FT-ラマンによる医薬品の ハイスループットスクリーニング

はじめに

近年、製薬産業では創薬プロセスと同様に、製剤開発プロセスにおけるハイスループットスクリーニング技術が重要視されています。特に、固体形状での識別および分類には、高水準のオートメーションが同時に要求されます。これは、固体形状での挙動を理解することは、医薬品の有効性や安全性の開発へつながると考えられるためです。例えば、医薬品有効成分 (API) の結晶構造が、長期安定性や体内での溶解性、効能などに大きく影響するということがわかっています。

ラマン分光法は、医薬品の分野では幅広く利用されており、固体構造を分子レベルで解析することができる有用な分析手法です。特に、非接触、非破壊分析法であることから、製剤原料の判別分析をはじめ、最終形状における結晶多形の判別や、各種成分の均一性および定量分析、さらには温度や湿度の変動に対する安定性評価など、その用途は多岐にわたります。また、ガラス越しにも測定できることから、ガラス容器内の溶液成分の判別や、溶質成分の定量分析、塩の形成挙動解析などにも適しています。

ここでは、ブルカー・オプティクスが提供するFT-ラマン分光計とハイスループットスクリーニング (HTS) アクセサリを用いた、医薬品の定性、定量分析への応用例について紹介します。

FT-ラマンシステム FT-ラマン分光計

ブルカー・オプティクスが提供するFT-ラマン分光計には、FT-ラマン専用機のMultiRAMと、FT-IR分光計にFT-ラマンモジュールのRAM IIを接続したハイブリッドタイプがあります (図1、2)。



図 1. FT-ラマン分光計 MultiRAM



図 2. FT-IR / ラマンハイブリッドシステム (VERTEX 70+RAM II)

FT-ラマンは分散型ラマンと比較して、高い波数分解能（最高 0.5cm^{-1} ）でスペクトルを取得することができます。フーリエ変換型分光法で得られるスペクトルの波数精度は、分散型と比較して1~2桁程度高く、正確にピーク位置を捉えることができます。その結果、より細かくピークが分離されたスペクトルを得ることができ、わずかなピークシフトも再現性良く捉えることが可能です。また、測定時間はスペクトルの波数範囲に影響を受けないため、スペクトル全体を数回に分けて測定しなければならない分散型ラマン分光計（特に高分解能測定時）よりも時間を短縮することができます。

一般的にラマン測定では、ラマン散乱光を覆い隠してしまう蛍光が問題となることが多く、この場合には蛍光の影響を抑制するために、波長の長い励起レーザーが使用されます。本システムでは、 1064nm および 785nm の近赤外レーザーを使用することで蛍光の影響を抑制することができ、更にゲルマニウム検出器との組み合わせで、高感度、低ノイズでスペクトルを取得することができます。例えば、医薬品原料の判別であれば、1検体あたり数秒程度の測定で分析することが可能です。

HTS- ラマンアクセサリ

図3に示す HTS- ラマンアクセサリは、96穴のマイクロプレートフォーマットを標準とし、MultiRAM および RAM II の試料室に装着して使用されます（図3）。測定対象試料の粉末をウェルの中に入れて、特別な調整を必要としません。このアクセサリでは、レーザー光は、ウェルの底面から照射されるため、試料の量に関係なく測定位置が常に一定に保たれます。レーザー光を上面から照射するシステムの場合は、レーザーの焦点に合わせて試料の高さを一定にする必要があり、調整に時間を要しますが、HTS- ラマンアクセサリは、底面から照射することで無駄な調整時間を省き、常に安定した測定を可能にします。さらには、バイアル瓶仕様のプレートを装着することで、バイアル瓶の底面からの測定も連続で行うことができます。これらの測定は、OPUS/LAB の洗練されたユーザーインターフェースを用いてシンプルな操作で行われます（図4）。



図 3. HTS- ラマンアクセサリ

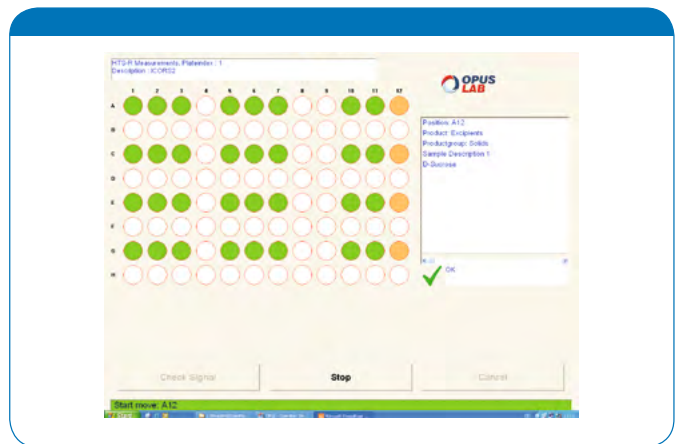


図 4. OPUS/LAB 測定ポジション設定

判別分析

ハイスループットスクリーニングにおいて典型的なアプリケーションは、医薬品有効成分（API）の結晶形や原材料の判別分析です。測定で得られた試料のスペクトルは、事前に測定した既知試料の標準スペクトルと比較され判別されます。ここでは、API とその他の賦形剤をリファレン

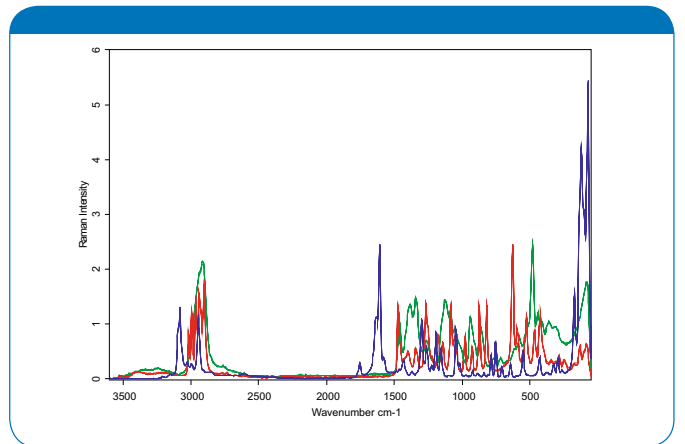


図 5. アセチルサリチル酸、フルクトース、デンプンの FT-ラマンスペクトル

スとし、HTS- ラマンアクセサリを用いて全自動測定を行った結果を示します。図5に、アセチルサリチル酸、フルクトース、デンプンを各3回測定したスペクトルを示します。非常に再現性の高いスペクトルが得られていることがわかります。

スペクトルの比較は、スペクトルの相違性或類似性を反映するユークリッド距離やマハラノビス距離などの値を計算することによって行われます。判別ライブラリ作成の重要なポイントは、図6に示すクラスター分析結果のように、それぞれの物質を混同することなく的確に判別できることにあります。FT-ラマン分光法では、最適なライブラリを作成することで、例えば構造の類似した糖類でも、スクロース、フルクトース、グルコースを的確に判別することができます。また、とうもろこし、ポテト、米等の由来の異なるデンプンも正確に判別することが可能です。図7は、全12種類の主薬と賦形剤を登録したリファレンスライブラリを用いて行った、未知試料の判別分析の結果を示します。ライブラリ中の化合物の一種と判別できた場合は、その化合物名と類似性を示すヒットクオリティ値を確認することができます。一方、測定した試料がライブラリ中の化合物であっても、スペクトルが部分的に異なり指定した閾値を外れた場合は、その結果が警告として表示されます。

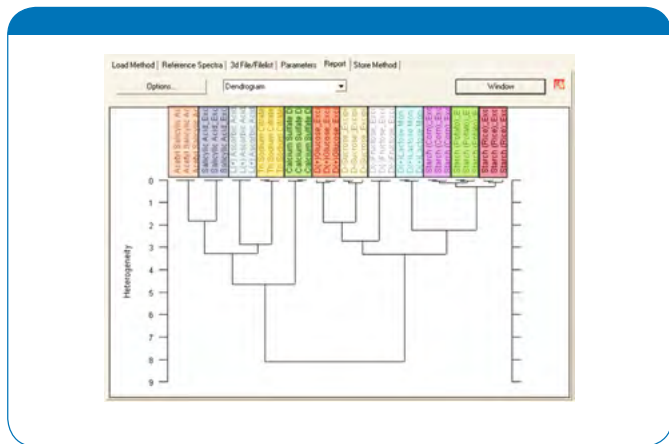


図 6. クラスター分析による分類

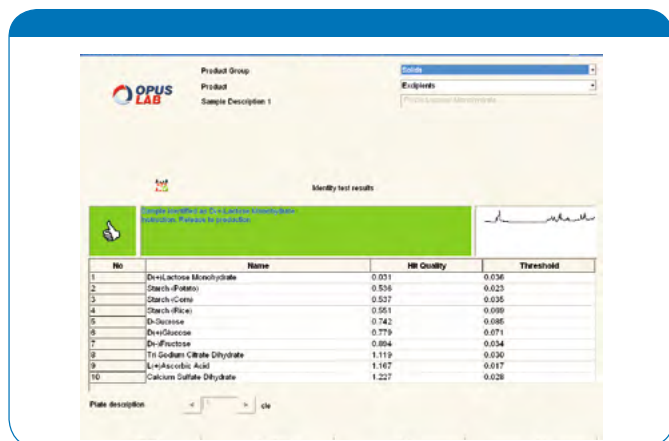


図 7. OPUS/LAB 判別分析結果

定量分析

ラマン分光法は、医薬品産業において、定性分析のみならず、定量分析でも重要な役割を果たしています。OPUSソフトウェアでは、定量モデルの開発に一変量と多変量の二つの解析メソッドを使用できます。その機能の一つである、PLS アルゴリズムを用いた検量線作成メソッドでは、定量に使用する波数領域とスペクトル前処理との最適な組み合わせを見つけ出す自動計算が行われ、短時間で高精度の検量線を作成することができます。ここでは、検量線作成のため、デンプンやセルロースを含む4種類の成分の混合比率を変えた15通りのリファレンス混合物を調製し測定しました。得られた15本のスペクトルについて、自動最適化計算機能を用いることで、各成分の検量線を作成しました。図8、9には、デンプンとセルロースの各濃度について、真値(縦軸)と検量線から求められた値(横軸)との相関を示します。各々の検量線について、平均予測誤差は2.5%、1.4%と求められ、高い相関が得られることがわかります。ここで作成した検量線を元に未知試料の定量分析を行うと、図10のような分析結果画面が表示されます。このとき、事前に複数の検量線を設定しておくことで、一度に多項目の定量分析を行うことができ、その結果は一覧で表示されます。

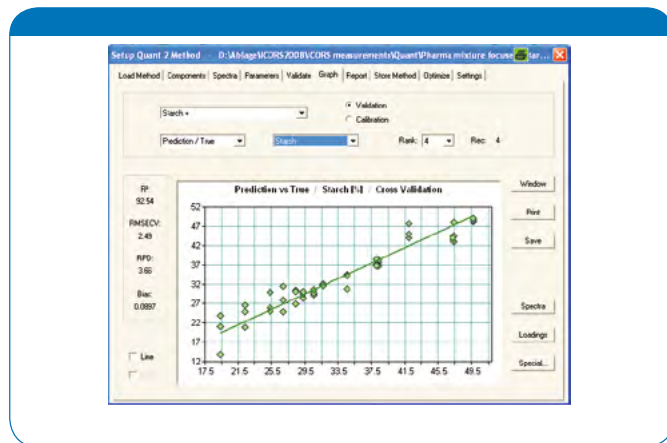


図 8. デンプン含有量の真値と多変量解析 PLS アルゴリズムで求めた値との相関

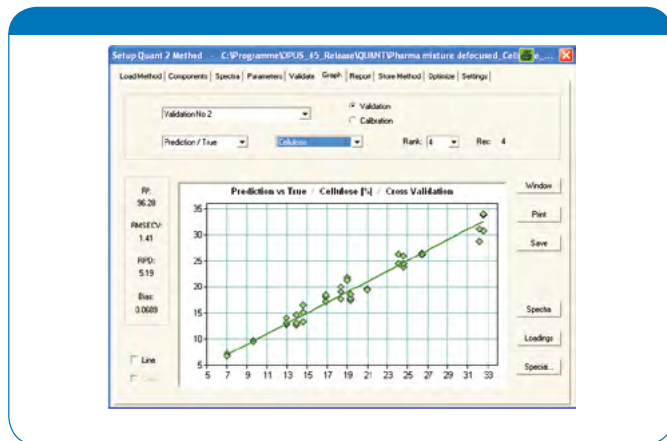


図 9. セルロース含有量の真値と多変量解析 PLS アルゴリズムで求めた値との相関

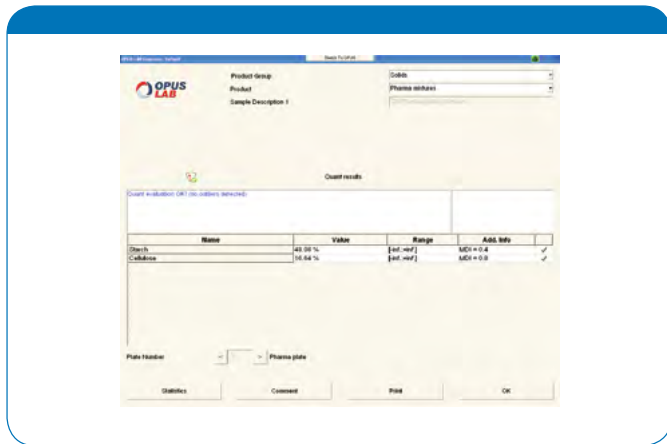


図 10.OPUS/LAB 定量分析結果

参考文献

- Morisette SL, Almarsson OE, Peterson ML, Remenar JF, Read MJ, Lemmo AV, Ellis S, Cima MJ, Gardner CR. J. Raman Spectrosc. 2004; 56: 275
- Kachrimanis K, Braun D, Griesser UJ. J. Pharm. Biomed. Anal. 2007; 43/2: 407
- Schmidt AG, Wartewig S, Picker KM. J. Raman Spectrosc. 2004; 35: 360
- Auer ME, Griesser UJ, Sawatzki. J. J. Mol Struct. 2003; 661-662: 307

まとめ

FT-ラマンと HTS-ラマンアクセサリの組み合わせは、医薬品試料の連続測定から、定性、定量分析までを自動的に行うことが可能な、理想的なスクリーニングシステムです。FT-ラマン分光計の特長である波数精度の高さや、近赤外レーザーの使用による蛍光の抑制は、製剤のみならず、さまざまな化合物に対して非常に有効です。また、直観的な操作性と充実した解析機能を有する OPUS ソフトウェアを用いることで、膨大な量のスペクトルデータも一括で処理でき、迅速な定性、定量分析を可能とします。



● ブルカー・オプティクス株式会社

本社：〒104-0033 東京都中央区新川 1-4-1 住友不動産六甲ビル
 Phone: 03-3523-6870 Fax: 03-3523-6871
 大阪営業所：〒532-0004 大阪市淀川区西宮原 1-8-29 テラサキ第2ビル
 Phone: 06-6394-8118 Fax: 06-6394-9003
 Marketing.BOPT.JP@bruker.com