

# FT-NIRによる凍結乾燥製品の 重要パラメーターの非破壊分析

## キーワード

Antaris、FT-NIR、QA/QC、凍結乾燥、水分、トロンビン、非破壊

## 要旨

凍結乾燥製品は受け入れ検査の際、容器を開封すると内容物が影響を受ける可能性があるため、QA/QC測定が難しいサンプルです。近赤外分光分析は、ガラスやプラスチックなどの容器をスキャンして内部のサンプルを非破壊的に分析できるため、凍結乾燥材料に最適なQCメソッドとしての地位を確立しています。本アプリケーションノートでは、医療および歯科分野で一般的に使用される局所凝固剤であるトロンビンの凍結乾燥サンプル分析を行い、Thermo Scientific™ Antaris™ II 近赤外アナライザーの性能を実証しました。凍結乾燥トロンビンの主要な安定性パラメーターは水分と力価であり、多変量解析を用いて単一のスペクトルから同時に予測することができます。また、凍結乾燥物の分析におけるその他の考慮事項についても議論します。

## はじめに

凍結乾燥は、食品業界と製薬業界において一般的なプロセスであり、サンプルの冷蔵の必要性をなくし、保存期間を劇的に延ばします。例えば、通常数カ月しか冷蔵保存できない製品を凍結乾燥することによって、室温で何年も安定して保存することができます。凍結乾燥は、昇華（液相を経ずに、水を固相から気相に移行させるプロセス）によってサンプル内の残留水分を除去することによって機能します。加熱プロセスでサンプルから水を除去しようとする、サンプルが破壊されることがあります。



Antaris II 近赤外アナライザー オートサンプラーアクセサリー付

昇華のプロセスは、バイアルに注入されたさまざまなバッファーおよび増量剤、標的化合物の溶液から始まります。バイアルに部分的に栓をして、溶液をガラス転移温度 ( $T_g$ )、または結晶性化合物の場合は共晶温度以下に凍結します。ガラス転移温度は、その温度以下では材料が本質的に固体であるため、水の除去を効率的に進めることができます。次に圧力を下げ、凍結乾燥プロセスを一次乾燥段階から開始します。一次乾燥段階でバルク水分を除去した後、二次乾燥段階で残留水分（時には8wt%よりも多い場合がある）を除去します。ここでは、所望の乾燥度が達成されるまで、圧力をさらに下げながら温度をゆっくりと上げていきます。最後にバイアルに栓をして密封します。

凍結乾燥した材料の最も根本的に難しい問題は、一度密封された材料をどのように分析するかということです。凍結乾燥されたファインケミカルまたはタンパク質は、それらに関連する多くの化学的および物理的特性を持っていますが、適切な分析技術がなければ、製品が安全で効果的であることを確認することができません。現在、凍結乾燥された材料は、バッチサンプリングによって分析されています。バッチサンプリングでは、ロットから少数のサンプルを選んで開封し、水分、API濃度、有効性などのパラメーターについて分析します。凍結乾燥材料のバッチテストは、いくつかの課題があります。選択したサンプルサブセットがロット全体を代表することが保証されないこと、サンプルが破壊されること、滴定、PAGE、ELISAなどの分析手法は手間がかかり、複雑で費用がかかること、などが挙げられます。

FT-NIR分光法は、分子の吸収振動を利用した現代的で簡便な技術です。FT-NIR分析では、ポリエチレンバッグやガラスバイアルのような梱包材をスキャンして、容器中のサンプルに関する情報を得ることができます。凍結乾燥された材料の場合、低エネルギーの光はバイアルを容易に透過して、対象の分析物に損傷を与えることなく分析できます。スペクトル情報を収集した後、多変量解析手法により、一つのスペクトルから複数の化学的または物理的パラメーターに関する情報を得ることができます。FT-NIRによる凍結乾燥サンプルの一般的なスキャン時間は15～30秒であり、カールフィッシャー滴定に必要な30～60分と比較すると、非常に効率的です。

本アプリケーションノートでは、凍結乾燥したタンパク質製剤である局所凝固剤トロンビンのFT-NIRによる分析について説明します。トロンビンの二つの重要なパラメーターは、水分（通常1.0%未満）と力価です。従来、水分の測定は、USPに準拠したカールフィッシャー滴定（USP <921>）によって行われています。力価の測定は、サンプルを血漿で滴定した後、光散乱測定によって行われています。サンプルの力価が高い場合は、トロンビンは血漿を凝固させて微粒子を生成します。力価が高ければ高いほど、より多くの微粒子が生成され、サンプルが散乱する光が大きくなります。上記の技術はいずれも破壊的であり、熟練のオペレーターを必要とします。さらに、どちらの手法も時間がかかり、溶媒、血漿、試薬などの消耗品が必要です。

このアプリケーションノートにおけるもう一つの例では、容器内の凍結乾燥物が正常にかたまりになった製品と、出荷時に粉末状に崩れて外観変化した製品との間の分光学的な違いについて詳しく説明します。これは粉末状に崩れて外観変化した凍結乾燥物は、製品として適していたとしても、かたまりの凍結乾燥物のみを使用した検量モデルに支障をきたす可能性があるという点で、区別することが重要です。

## 実験

水分と力価の検量線を作成するために、10個のトロンビンサンプル2セットを準備しました。サンプルは完成品のロットから採取し、Antaris II 近赤外アナライザーを使用してバイアルのまま分析しました。右に示すオートサンプラーRSアタッチメントを使用して、オペレーターによるサンプルの入れ替え操作なしで、全てのサンプルデータを取得しました。各サンプルについて、 $4.0\text{ cm}^{-1}$ の分解能で32回のスキャンを行い平均化しました。各サンプルの分析にかかった時間は約20秒です。スキャンされた波長範囲は $4,000\text{ cm}^{-1}$ から $10,000\text{ cm}^{-1}$ でした。10個のサンプルをFT-NIRで分析した後、従来の測定手法であるカールフィッシャー滴定を用いた水分測定と、光散乱滴定を用いた力価測定を行いました。これらの測定値は、その後、Thermo Scientific™ TQ Analyst™ ケモメトリックスソフトウェアを使用して、多変量解析法でスペクトルデータと組み合わせました。



オートサンプラーRSアタッチメント

## 結果と議論

### 水分

10個のサンプルについて、Antaris II 近赤外アナライザーのスペクトルデータと、カールフィッシャー滴定による測定値とを組み合わせました。水分値は約0.5%から0.8%の範囲でした。これらのデータを、TQ Analyst ケモメトリックスソフトウェアを使用して結合し、SMLR (Stepwise Multiple Linear Regression) アルゴリズムを使用してケモメトリックスモデルを作成しました。近赤外スペクトルのデータ前処理は一般的に、さまざまなアルゴリズムが分析対象物を正確に予測するのに役立ちます。いくつかのケースでは、生のスペクトルの一次または二次微分スペクトルが、定量においてより効果的な場合があります。他の前処理は、乗算散乱補正または標準正規変数、平滑化、またはベースライン補正のようなパスレングスアルゴリズムを含みます。今回の場合、水分は近赤外領域では強い吸収体であるため、前処理は最小限にとどめました。スペクトルの二次微分は、Norris平滑化フィルター (9, 2) を用いて検量線作成に供されました。選択した領域は、水の第一倍音である $7,000\text{ cm}^{-1}$ 付近です。標準試料10個の水の第一倍音領域を図1に示しますが、生のスペクトルから水分濃度の違いが容易に確認できます。

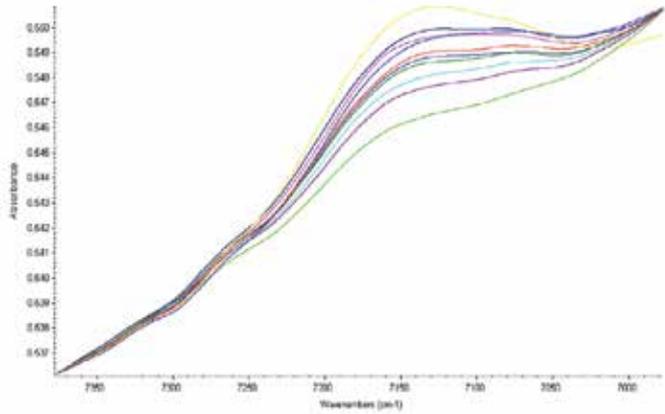


図1. 水の倍音領域のスペクトル

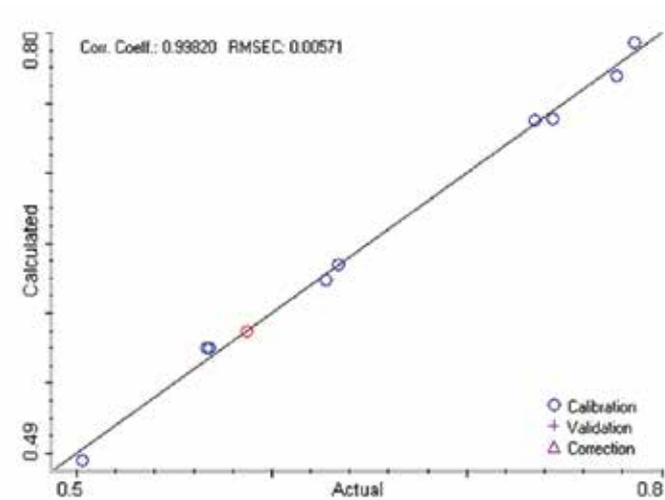


図2. 水分の検量線

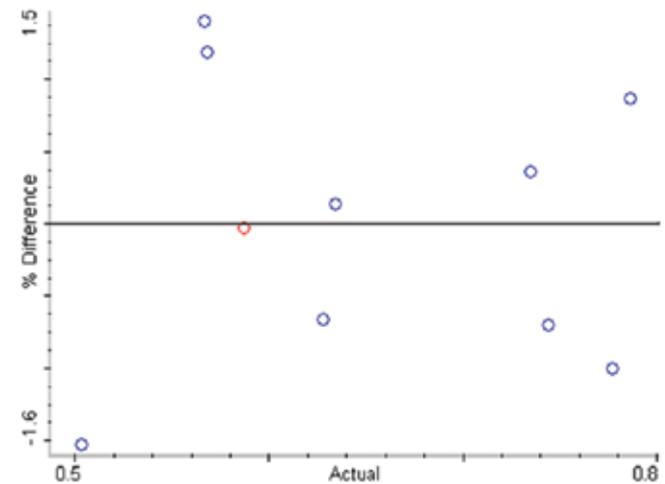


図3. 水分の残差

水分の検量線と%残差を図2と3に示します。相関係数（データが直線でフィットする度合いのことで、理論的には1.0が完全一致を表します）は0.998、検量線の二乗平均平方根誤差（RMSEC）は0.005です。これらのパラメータはいずれも、データへの優れた適合性を示しています。クロスバリデーションは、特定の手法で安定性を評価する信頼性が高い方法です。検量線から各検量値を一つずつ外し、残りの九つの検量値に対して予測します。この方法が堅牢であれば、これらの除去された標準値の予測値は、元の値からそれほど離れません。クロスバリデーションで検量線が著しく悪化するようであれば、その方法を見直し、さらに標準物質を追加する必要があります。トロンビン中の水分のクロスバリデーションでは、相関係数は0.984、クロスバリデーションの二乗平均平方根誤差（RMSECV）は0.018でした。クロスバリデーションでは検量線からの直線フィットに若干の変化が見られましたが、RMSECVはRMSECの数倍であり、比較的安定した方法であることを示しています。水分のクロスバリデーション曲線を図4に示します。

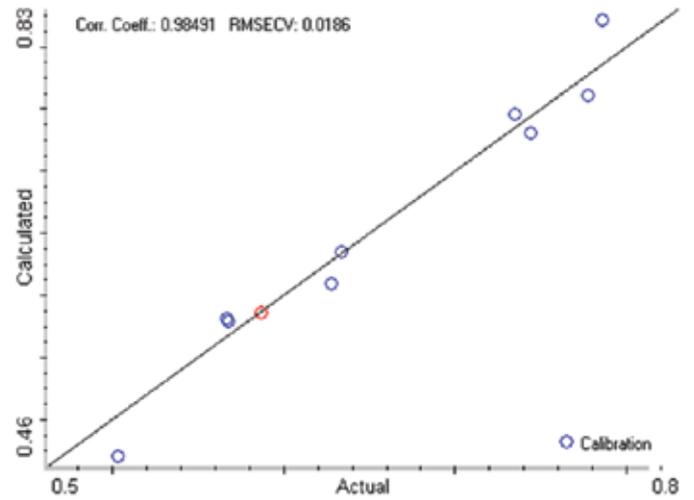


図4. 水分のクロスバリデーション

FT-NIRは二次的な手法であるため、一次的な方法（ここでは滴定などの分析方法）で暗黙のうちに発生する誤差は、定義上、FT-NIR検量線に含まれることになります。滴定分析の誤差を最小限に抑えることができれば、NIRデータの検量線はさらに改善されるはずで。

### 力価

力価分析は、滴定散乱測定から得られた基準力価データと、10個のトロンビンサンプルの2セット目のスペクトルデータを相関させることによって行われました。これらのサンプルの力価は約29,000から33,000でした。

このデータセットの前処理は、水分の場合の前処理とは若干異なります。ここでは、Norris平滑化フィルター (9, 5) を用いた二次微分スペクトルに部分最小二乗法 (PLS) アルゴリズムを使用しました。パスレングス補正には、乗算散乱補正を用いました。力価の分析領域は $6,000\text{ cm}^{-1}$ から $6,800\text{ cm}^{-1}$ とし、この領域は水の倍音の中間に位置します。この場合の検量線 (図5) は相関係数0.999、RMSECは21.9と優れていました。残差率 (図6) は、一つのサンプルの残差が-0.18であったものの、力価の予測値は $\pm 0.09\%$ でした。予測誤差二乗和 (PRESS) も妥当な傾向を示しました (図7)。妥当な検量線の場合、PRESSプロットは高い値から始まり、最小値に向かう傾向を示し、その後は横ばいとなるか、わずかに増加するはずです。検量線のクロスバリデーションでは、残差の増加が $\pm 2.0\%$ であることが示されましたが、高濃度標準と低濃度標準は、検量線で過小評価であったため、誤差が大きくなりました。

### 判別分析による凍結乾燥物の外観変化

凍結乾燥した材料の主な問題は外観変化です。一度凍結乾燥サイクルを経ると、サンプルは多孔質形状のかたまりになります。しかし、箱詰めして出荷した後、多くのサンプルが粉状の形態に変化してしまふことがあります。正常な凍結乾燥物は、外観変化した粉末状の凍結乾燥物と分光的に区別できるのでしょうか？

TQ Analyst ケモメトリックソフトウェアの判別分析アルゴリズムを使用して、これら二つのタイプのサンプルを容易に区別できることを示します。図8は、正常な凍結乾燥物を用いた10個のトロンビンサンプルと、粉末状にした凍結乾燥物を用いた10個のサンプルの主成分プロットを示しています。主成分分析とは、スペクトルの変動 (複数の波長と吸光度) を主成分と呼ばれる使用可能なデータ量まで減らす方法です。サンプルの主成分データをx-y平面にプロットすると、スペクトル的に異なる集団を非常に簡単に区別できるようになります。主成分プロット (図8) から、外観変化した粉末状のスペクトルを簡単に識別し、必要に応じて補正することができます。正常な凍結乾燥サンプルの代わりに、外観変化した粉末状のサンプルを使用したメソッドでも、主成分分析を用いた判別分析で同様の結果が得られました。

外観変化した粉末状のデータは、二つのサンプルセット (正常な凍結乾燥物と外観変化した粉末状の凍結乾燥物) の間に分光学的違いがあるものの、これらは単純な散乱オフセットとして、一方のサンプルが他方のサンプルよりも多く散乱し、ベースラインが異なることを示しています。

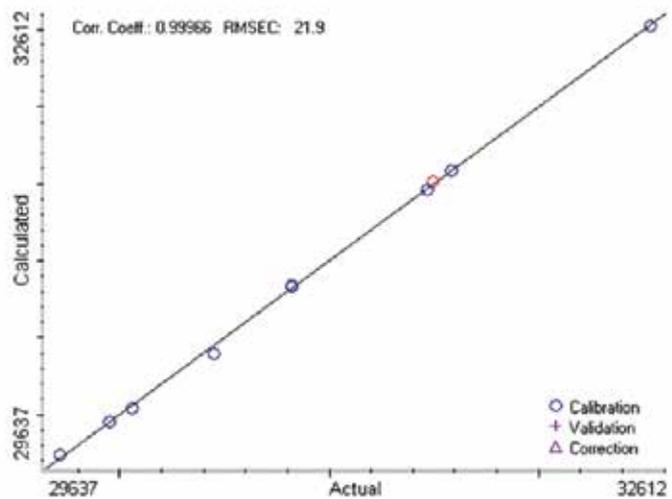


図5. 力価の検量線

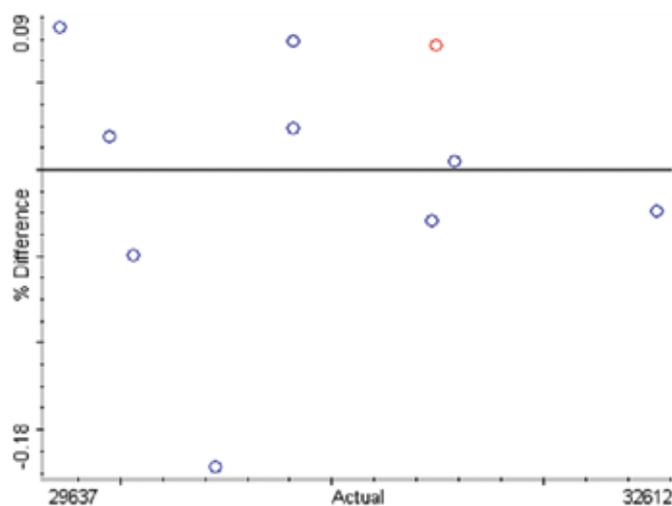


図6. 力価の残差

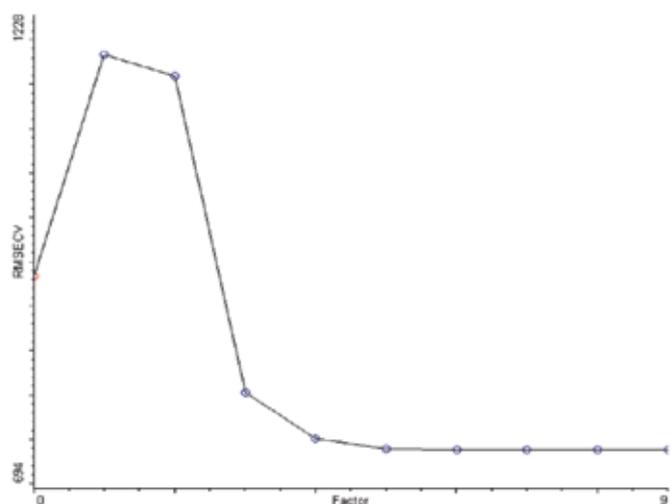


図7. 力価のPRESSプロット

凍結乾燥物の外観変化の程度が大きい場合、吸光度差が観測されることがあるかもしれません。この場合、外観変化したサンプルは、サンプルのデータ変動に基づいて、さらに標準試料として加えることで補正できます。かたまりの凍結乾燥物を使用して作成されたメソッドに、外観変化した粉末状のデータを追加する場合は、粉末状の標準スペクトルを元のメソッドに加えます。これにより、サンプルの外観変化の影響を容易に補正できます。

### 結論

Antaris II 近赤外アナライザーを用いたFT-NIR分析は、凍結乾燥材料を分析するための、効果的で迅速かつ非破壊的な方法であることが示されました。

今回の分析では、カールフィッシャー滴定法と光散乱法を用いて、水分と力価の両方を調べ、その値を利用しました。また、主成分分析を用いて、正常な凍結乾燥物のかたまりと外観変化した粉末状の凍結乾燥物を区別できることを示しました。

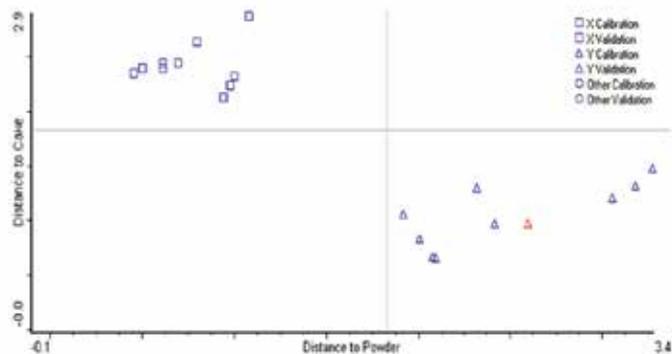


図8：主成分プロット、外観変化した粉末状の凍結乾燥物と正常な凍結乾燥物

 **詳細はこちらをご覧ください [thermofisher.com/nir](https://thermofisher.com/nir)**

研究用にもみ使用できません。診断用には使用いただけません。  
© 2021, 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.  
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.  
実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。  
価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。  
標準販売条件はこちらをご覧ください。thermofisher.com/jp-tc **FTIR118-B2207CE**

## サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

 TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671

 [Analyze.jp@thermofisher.com](mailto:Analyze.jp@thermofisher.com)

 [facebook.com/ThermoFisherJapan](https://facebook.com/ThermoFisherJapan)

 [@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

[thermofisher.com](https://thermofisher.com)