

## 2 成分分析における ZIM を用いた解析の紹介

フィジオマキナ株式会社 白濱茜

### 【目的】

2つの成分を含む医薬品の定量を行う場合、それぞれを独立して解析できるよう、試験条件を検討する必要がある。例えば、高速液体クロマトグラフィー（UV 検出）を用いて分析を行う場合、2つの成分を適切に定量できる UV 波長や、ピークを分離するための測定条件（移動相条件、カラム選定等）等の検討が必要になる。場合によっては、それぞれの成分で別の試験法を設定する必要もあり、試験法検討に要する労力は決して小さいものとは言えない。しかし、製剤検討の初期段階では、簡易的ではあれ、ある程度の有用な試験法が必要となり、試験法開発にスピード感が求められる。

2成分分析の解析手法の1つとして、Rainbow 測定における ZIM（Zero Intercept Method）がある。これは、AuPRO ソフトウェア解析において、単一成分のスペクトルを2次微分した際に、ゼロポイントを示

す波長では、スペクトル強度が他成分に影響を及ぼさないことを利用した解析手法である。

本アプリケーションノートでは、*p*-アセトアミドフェノール及びカフェインの混合溶液の測定における ZIM 解析の手順を紹介する。

### 【試験手順】

#### 1. 検量線の取得

- (1) 各サンプルを表1の濃度となるようメタノールに溶解させ、Stock Solution とした。
- (2) ガラスバイアルにクロススターラーバーと脱気した水 20 mL を加えた。
- (3) 光路長 10 mm のチップを取り付けたプローブを水に浸し、気泡を取り除いて 100%T を取得した。
- (4) 各 Stock Solution を添加し、表1の検量線範囲内で4~6点の濃度溶液を測定した。

表1 Stock Solution 濃度及び検量線の濃度範囲

サンプル名	Stock Solution 濃度 (mg/mL)	検量線範囲 (µg/mL)
<i>p</i> -アセトアミドフェノール	10	0~50
カフェイン	1	0~12

### 2. 試料溶液の測定

#### 2-1. 検討 I

2成分の混合溶液を調製することで、同時に2成分の濃度を変化させる測定を実施した。

- (1) *p*-アセトアミドフェノール約 100 mg

及びカフェイン約 12 mg をメタノールに溶かして 20 mL とし、混合溶液とした。

- (2) ガラスバイアルにクロススターラーバーと脱気した水 20 mL を加えた。
- (3) 光路長 10 mm のチップを取り付けた

プローブを水に浸し、気泡を取り除いて 100%T を取得した。

(4) 以下の条件で試験を開始した。

温度 : 37°C

回転速度 : 200 rpm

Sampling Interval : 10 秒

(5) 試験開始後、30 秒ごとに混合溶液を添加し、6 点 (濃度 0 を含む) で濃度を変化させた。

## 2-2. 検討 II

あらかじめ *p*-アセトアミドフェノールを加えておいた溶液にカフェインを添加し、1 成分のみの濃度を変化させる測定を実施した。

- (1) ガラスバイアルにクロススターラーバーと脱気した水 20 mL を加えた。
- (2) 光路長 10 mm のチップを取り付けたプローブを水に浸し、気泡を取り除いて 100%T を取得した。
- (3) 表 1 の濃度で調製した *p*-アセトアミドフェノールの Stock Solution 100  $\mu$ L を添加し、混合した。

(4) 以下の条件で試験を開始した。

温度 : 37°C

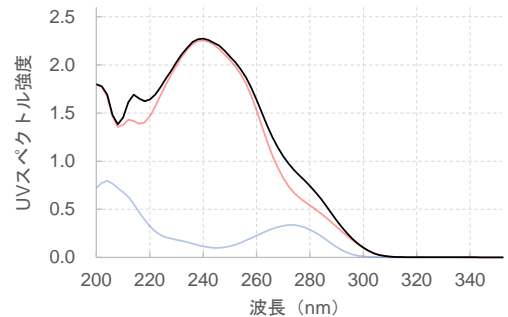
回転速度 : 200 rpm

Sampling Interval : 10 秒

(5) 試験開始後、30 秒ごとに表 1 の濃度で調製したカフェインの Stock Solution を添加し、6 点 (濃度 0 を含む) で濃度を変化させた。

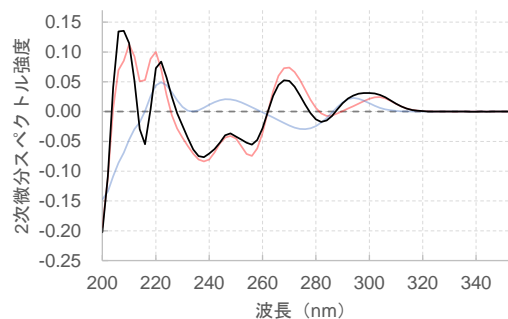
## 【結果】

2 成分混合溶液と単一成分につき、UV スペクトルの重ね書きを図 1 に、2 次微分スペクトルの重ね書きを図 2 に示す。



— 混合溶液 — *p*-アセトアミドフェノール — カフェイン

図 1 UV スペクトルの重ね書き  
(混合溶液+単一成分)



— 混合溶液 — *p*-アセトアミドフェノール — カフェイン

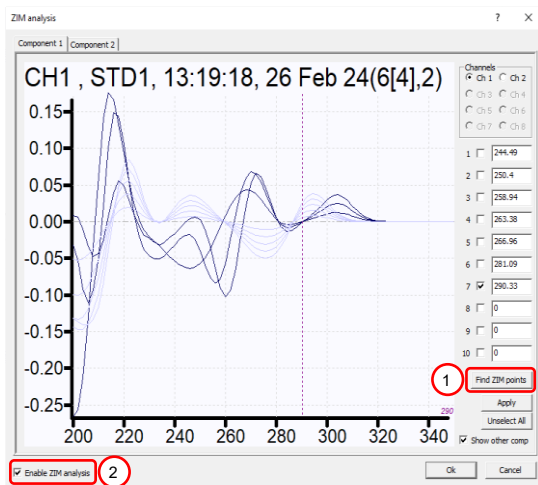
図 2 2 次微分スペクトルの重ね書き  
(混合溶液+単一成分)

UV スペクトルや 2 次微分スペクトルにおいて、各成分に特徴的な波長を手動で選択することが難しいことがわかる。

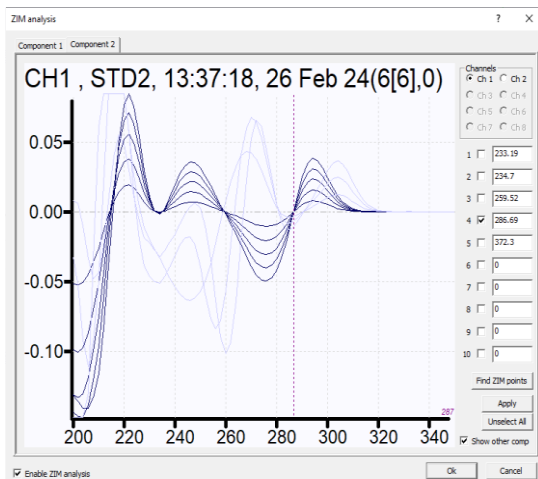
そこで、以降の手順に従い、ZIM ポイントの選択、混合溶液中の各試料の解析を行った。

## 1. ZIM ポイントの選択

Standard 1 に *p*-アセトアミドフェノールの検量線, Standard 2 にカフェインの検量線データをそれぞれ登録し, 「Tools」 タブから [ZIM analysis] を選択した. 表示されたウィンドウ (図 3) にて ZIM ポイントを選択した.



a. *p*-アセトアミドフェノール (Component 1)



b. カフェイン (Component 2)

図 3 ZIM ポイントの選択

Component 1 タブ (図 3 a) 中にて濃色スペクトルで示されているのは *p*-アセトアミドフェノールの 2 次微分スペクトルであ

る. [Find ZIM points] (図 3 a 中①) を押して ZIM ポイントを自動検出した. それらの中からカフェインの計算に使用する波長として, すべての濃度スペクトルで強度がゼロであり, カフェインの ZIM ポイントと重なっていないポイントを選択した. この操作は, チャンネルごとに実施した.

Component 2 タブ (図 3 b) においても同様に操作を行い, 各チャンネルにおける *p*-アセトアミドフェノールの解析に使用する ZIM ポイントを選択した.

[Enable ZIM analysis] (図 3 a 中②) にチェックマークを入れ, ZIM ポイントを使用する解析を実施した.

## 2. 試料溶液の解析

< 検討 I >

試験手順 2-1 に従って取得した 2 次微分スペクトルの重ね書きを図 4 に示す.



図 4 2 次微分スペクトルの重ね書き (検討 I)

図 4 中に赤色実線で示した波長が *p*-アセトアミドフェノールの解析波長, 青色破線で示した波長がカフェインの解析波長である. 各試料における濃度とスペクトル強度の関係を図 5 に示す.

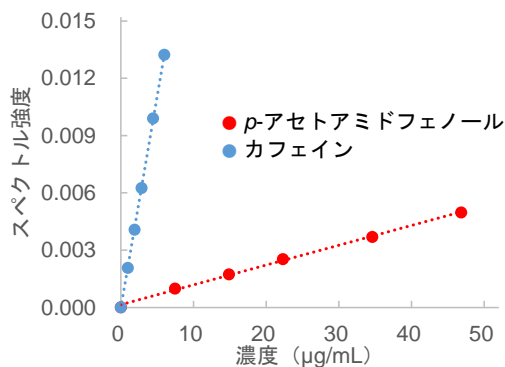


図5 濃度-スペクトル強度の関係  
(検討Ⅰ)

直線の相関係数は、*p*-アセトアミドフェノールが 0.9990、カフェインが 0.9999 であり、いずれも良好な直線性が得られた。

#### <検討Ⅱ>

試験手順 2-2 に従って取得した 2 次微分スペクトルの重ね書きを図 6 に示す

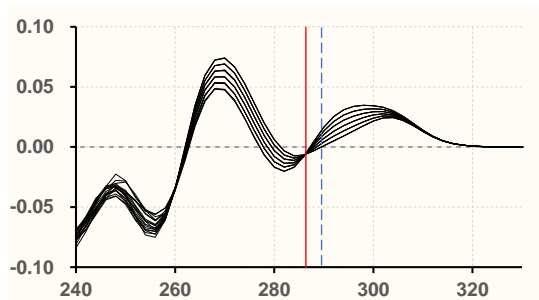


図6 2次微分スペクトルの重ね書き  
(検討Ⅱ)

図4と同様、図6中の赤色実線が *p*-アセトアミドフェノール、青色破線がカフェインの解析波長である。各測定時点における *p*-アセトアミドフェノールのスペクトル強度推移及びカフェインの濃度とスペクトル強度の関係を図7に示す。

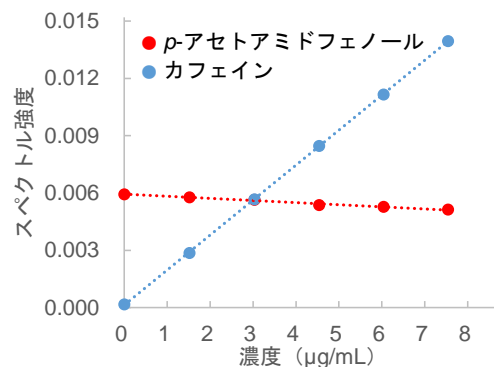


図7 濃度-スペクトル強度の関係  
(検討Ⅱ)

*p*-アセトアミドフェノールのスペクトル強度はカフェインの Stock Solution 添加に伴う全液体量増加に伴う減少傾向を示したのみで、カフェインによる影響は見られなかった。また、カフェインの直線の相関係数は 1.0000 であり、良好な直線性が得られた。

#### 【結論】

スペクトルにて単一成分ごとの定量を行うことが難しい混合溶液であっても、AuPRO ソフトウェアの ZIM 機能を使用し解析を行うことで、他方の成分の影響を受けずに定量することができた。このことから、Rainbow 測定における ZIM 解析は測定対象 2 成分を含む同時解析の手法として有用であると言える。ただし、成分の組み合わせや試験液の種類、溶液濃度等によっては、両成分の適切な ZIM ポイントを設定できない可能性がある。あらかじめ、単一成分のスペクトルから ZIM ポイントとして設定可能な波長の有無を確認して進めることを推奨する。