

分光蛍光光度計 RF-6000による デュロキセチン塩酸塩の低濃度測定

医薬品化合物は微量であっても薬効や副作用を発現するため、医薬品に含有される各成分量を管理することは、医薬品の品質や安全性を確保する上で重要です。対象成分が微量である場合には、高感度で高選択的な蛍光検出を利用する分析手法が適用できます。

ここでは、抗うつ薬の一つであるデュロキセチン塩酸塩を測定し、検出下限値と定量下限値を評価しました。

K. Maruyama, R. Fuji

RFによる低濃度測定

光を使った分析法として、吸光光度法と蛍光光度法があります。吸光光度法は物質に光を照射し、物質を通過した透過光を測定します。一方、蛍光光度法は物質に光を照射し、物質が発する蛍光を測定します。

吸光光度法では(1)式に示すランバート・ベールの法則が成り立ち、光路長が一定であれば吸光度は濃度に比例します。一方、蛍光光度法の場合、(2)式に示すように、蛍光強度は試料によって吸収された光量と蛍光の発光効率を表す量子収率の積で表されます。さらに、試料濃度が薄い場合は、(1)、(2)式を使って(3)式が導き出されます。定量分析では波長が固定で光路長も一定ですので、蛍光強度は吸光度と同様に濃度に比例します。

吸光光度法では対照光束と試料光束の光量差の検出限界が感度を決定しますが、蛍光光度法はゼロの状態からの発光強度を検出するので、吸光光度法に比べて100倍～1000倍程度感度が高く、低濃度試料の測定に適しています。

$$\text{Abs} = \text{Log}_{10}(I_0/I) = \epsilon cL \quad (1)$$

Abs: 吸光度、 I_0 : 入射光の強度、 I : 透過光の強度
 ϵ : モル吸光係数、 c : 試料濃度、 L : 光路長

$$F = (I_0 - I)\Phi \quad (2)$$

F : 蛍光強度、 I_0 : 励起光の入射強度、 I : 透過光の強度、 Φ : 量子収率

$$F = 2.303 \epsilon cL\Phi I_0 \quad (3)$$

使用装置

分光蛍光光度計 RF-6000の外観を図1に示します。RF-6000はクラス最高レベルのSN比1,000以上 (RMS) を実現し、低濃度測定に対応できます。



図1 分光蛍光光度計 RF-6000

デュロキセチン塩酸塩

デュロキセチン塩酸塩は、うつ病・うつ状態および糖尿病性神経障害、線維筋痛症、慢性腰痛症、変形性関節症に伴う疼痛に効能・効果を有します。化学構造式を図2に示します。特徴は表1の通りです¹⁾。

表1 デュロキセチン塩酸塩の特徴

化学名: (+)-(S)-N-Methyl-3-(1-naphthyl)-3-(2-thienyl)propylamine monohydrochloride
分子式: C₁₈H₁₉NOS · HCl
分子量: 333.88
性状: 白色の粉末又は塊である。
メタノール又はジメチルスルホキシドに溶けやすく、エタノール (99.5) にやや溶けやすく、水にやや溶けにくい。
融点: 165℃

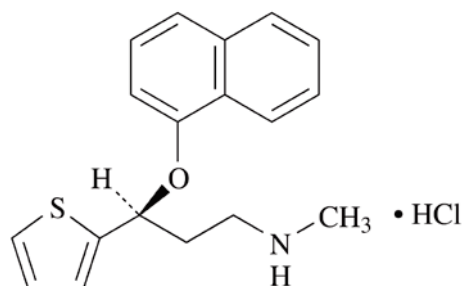


図2 デュロキセチン塩酸塩の化学構造式

■ デュロキセチン塩酸塩の低濃度測定

デュロキセチン塩酸塩を0.05 mol/Lの酢酸溶液に溶解し、0.01~0.80 μg/mLの標準溶液を調製しました。3次元蛍光スペクトルを計測することにより最適な励起波長を確認した後、表2に示す測定条件で検出下限値と定量下限値を評価しました。

表2 測定条件

装置	: 分光蛍光光度計 RF-6000
励起波長	: 237 nm
蛍光波長範囲	: 290~400 nm
蛍光波長	: 337 nm
スキャン速度	: 600 nm/min
サンプリングピッチ	: 1.0 nm
バンド幅	: Ex 10 nm, Em 10 nm
感度	: High

デュロキセチン塩酸塩の標準溶液における蛍光スペクトルを図3に、337 nmの蛍光強度で作成した検量線を図4に示します。相関係数の二乗は0.99987と良好な結果が得られました。

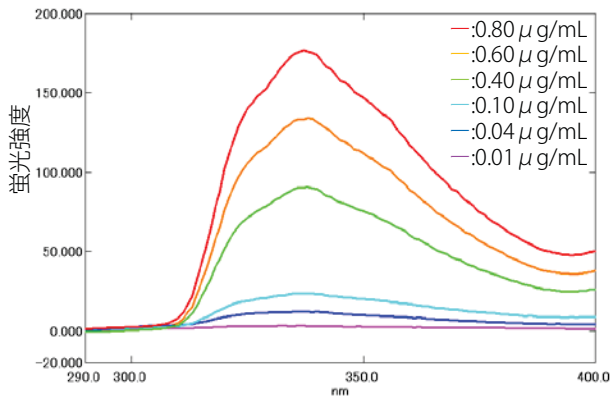


図3 デュロキセチン塩酸塩の標準溶液の蛍光スペクトル

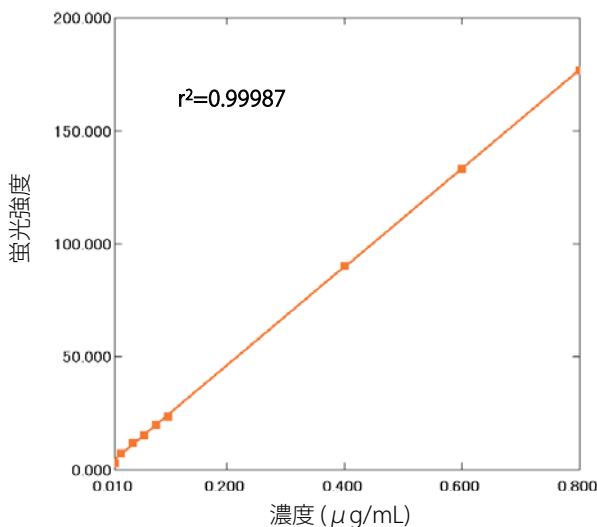


図4 検量線

■ 検出下限値と定量下限値

検出下限値とは、ブランク（空試験値）の信号分布に被測定物質が検出されないと言える最低濃度で、最もよく使われるのは、ブランクの平均値から+3σ離れた値（濃度）です。σは標準偏差を表します。一方、定量下限値は、定量結果が十分な信頼性を有することのできる最低濃度で、最もよく用いられるのはブランクの平均値から+10σ離れた値（濃度）です²⁾。

いずれの値も(4)式から算出できます。なお、検出下限値の場合はk=3、定量下限値の場合はk=10とします。

$$A = \frac{k\sigma}{a} \quad (4)$$

A: 濃度、σ: ブランクの標準偏差、a: 検量線の傾き

図4における検量線式は以下の通りです。

$$y \text{ (蛍光強度)} = 218.371x \text{ (濃度)} + 2.34753$$

(4)式に各値を代入して算出したデュロキセチン塩酸塩の検出下限値と定量下限値を表3に示します。

表3 デュロキセチン塩酸塩の検出下限値と定量下限値

検出下限値	定量下限値
0.0002 μg/mL (0.2 ppb)	0.0007 μg/mL (0.7 ppb)

RF-6000による蛍光光度法ではノイズが少ないスペクトルが得られました。検出下限値は0.0002 μg/mL、定量下限値は0.0007 μg/mLであり、非常に低濃度まで測定できることが示されました。

■ まとめ

分光蛍光光度計 RF-6000を用いて、抗うつ薬の一つであるデュロキセチン塩酸塩を測定し、検出下限値と定量下限値を評価しました。いずれも良好な結果を示し、蛍光光度法が低濃度測定に適していることが示されました。医薬品開発など試料量が限られる分析に有効です。

■ 参考文献

- 1) <https://pins.japic.or.jp/pdf/newPINS/00058451.pdf> (2019年9月18日時点)
- 2) 上本道久、検出限界と定量下限の考え方、ぶんせき、2010、5