

機能性食品・化粧品における脂肪酸の同定と検証

このアプリケーションノートでは、化粧品や機能性食品(ニュートラシューティカルズ)に含まれる脂肪酸と同様の脂肪酸を、メトローム社のインスタントラマン分析装置 Mira P を用いて同定および検証する方法について説明します。機能性食品(ニュートラシューティカルズ)とは、基本的な栄養価に加えて、さらなる健康効果をもたらすと謳う食品由来の製品です。個人の健康産業が自然派ホメオパシー療法へと移行するにつれ、ビタミンEの供給源でありながらLDL(「悪玉」)コレステロールを増加させないオイ

ルなど、食事にビタミンや脂肪酸を補給することの利点を訴える新製品が数多く登場しています。機能性食品には、FDA(米国食品医薬品局)の規制を受けているものと、そうでないものがあります。いずれにせよ、製造業者にとって、自社製品が社内および社外の規制を満たすことは重要です。成分の同一性と純度の判定は製品の品質確保に不可欠であり、製造工程開始前に成分を検査することで、コストのかかる時間的遅延や標準以下の製品品質を防ぐことができます。

はじめに

脂肪酸は製造工程で検証する必要があります。脂肪酸の類似性により、ピアソン相関アルゴリズムによる正確な脂肪酸の同定が困難になる場合があります。しかし、p値検証により、製造工程で正しい材料が使用されていることが保証されます。MIRA Pは、サンプルの迅速かつ非破壊的な同定と検証のために設計された携帯型ラマン分光計です。サンプルの同定では、サンプルのスペクトルを測定し、ライブラリ内の既存のスペクトルと相関させます。結果はピアソン相関とともに表示されます。サンプルの検証は、同じ材料の異なるサンプル間の許容される変動を含むスペクトルのトレーニングセットを用いて行われます。トレーニングセットは主成分分析(PCA)を用いて分析され、測定されたサンプルがオ

ペレーターが設定した信頼水準内にある確率(パーセント)として報告されます。通常、材料の検証には95%の信頼水準が使用されます。ライブラリからの同定とトレーニングセットによる検証はどちらも有用ですが、検証ではサンプル内の非常に小さな差異を検出できます。このアプリケーションノートで扱う脂肪酸と脂肪アルコールは、ラウリン酸($C_{11}H_{23}CO_2H$)、ミリスチン酸($C_{13}H_{27}CO_2H$)、パルミチン酸($C_{15}H_{31}CO_2H$)、ステアリン酸($C_{17}H_{35}CO_2H$)、ステアリルアルコール($C_{17}H_{37}OH$)です。図1はこれらの物質のスペクトルとスペクトルの類似性を示しており、相関関係のみで区別することが困難であることを示しています。

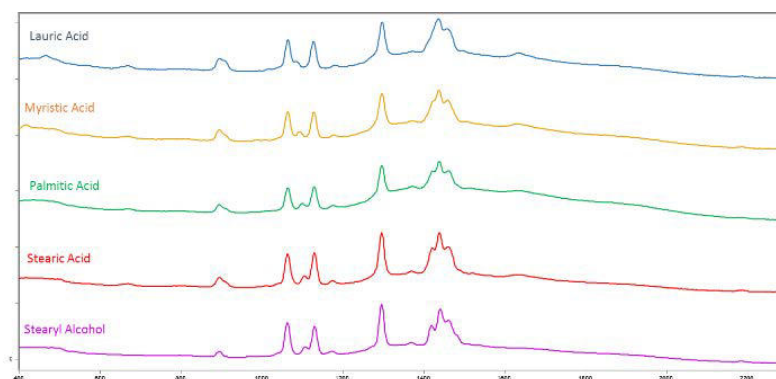


図 1. 本アプリケーションノートで扱う脂肪酸および脂肪アルコールのラマンスペクトル

測定

操作手順 (OP: Operating Procedure) の作成

MiraCalソフトウェアにおいて、「Operating Procedures」タブを選択し、新しい操作手順(OP)として「Fatty Acids」を作成します。パラメータは、レーザー出力を5、平均回数を1、自動積分時間に設

定します。作成したOPを用いて各サンプルのスペクトルを取得し、各サンプルには注意深く名称を付けてください。その後、取得したデータをMiraCalソフトウェアのデータベースと同期させます。

脂肪酸ライブラリの作成および性能確認

「Fatty Acid」OPを使用して保存されたサンプルから、脂肪酸ライブラリを作成することができます。

「Libraries」タブを選択し、新しいライブラリに「Fatty Acid Library」という名称を付けて作成します。先に収集したサンプルをこの「Fatty Acid Library」に追加し、ライブラリを保存してください。

次に、「Library Testing」という名称の新しい操作手順書(OP)を作成し、パラメータはレーザー出力

5、平均回数1、自動積分時間に設定します。「Evaluations」タブを選択し、「Identification(識別)」のチェックボックスを有効にして、「Fatty Acid Library」を選択します。「Library Testing」OPを保存し、システムと同期させてください。

これにより、システムはサンプルを「Fatty Acid Library」と照合するために使用できるようになります。各脂肪酸サンプルのマッチスコアの一例は、表1に示されています。

p値を用いた脂肪酸トレーニングセットの作成および検証

前の作業で作成した「脂肪酸」OPを選択し、各脂肪酸サンプルの約20個のスペクトルを収集します。完了したら、機器をMiraCalソフトウェアに接続し、データをデータベースに同期します。次のステップは、各サンプルのトレーニングセットを作成することです。ソフトウェアの[トレーニングセット]タブを選択し、サンプル名をトレーニングセット名として入力し、前のステップで収集した約20個のスペクトルを追加することで、各材料の新しいトレーニングセットを作成します。5つのトレーニングセットがすべて作成され保存されたら、次のステップは、

各トレーニングセットに対応する新しいOPを作成することです。5つのOPはすべて、自動積分、レーザーパワー5、平均1に設定された同じ取得パラメータを持ちます。OPの[評価]タブで、各OPの[検証]ボックスをオンにし、[トレーニングセット]ボタンを押して対応するトレーニングセットを追加します。これが完了したら、各OPを保存し、ソフトウェアデータベースを同期して、OPをシステムに追加します。各サンプルのスペクトルを各OPに対して測定します。合否結果は表2に記録されています。

測定結果

前述のとおり、単純なライブラリマッチング(ピアソン相関)では、ライブラリ内に類似した物質が存在する場合、正確に目的の物質を識別できないことがあります。類似物質間のマッチスコア(Hit Quality

Index:HQI)の差がわずか0.01~0.03程度であることもあり、そのような場合は判別が困難で、分析結果の信頼性を低下させる可能性があります(表1を参照)。

表1.本アプリケーションノートで評価された各種脂肪酸および脂肪アルコール間のピアソン相関値

サンプル	ピアソンの相関係数	照合サンプル
パルミチン酸	1.00	パルミチン酸
	0.98	ミリスチン酸
	0.98	ステアリン酸
ステアリルアルコール	1.00	ステアリルアルコール
	0.97	ステアリン酸
	0.93	パルミチン酸
ラウリン酸	1.00	ラウリン酸
	0.98	ミリスチン酸
	0.95	パルミチン酸
ミリスチン酸	1.00	ミリスチン酸
	0.98	パルミチン酸
	0.98	ラウリン酸
ステアリン酸	1.00	ステアリン酸
	0.97	パルミチン酸
	0.95	ステアリルアルコール

検証では、測定サンプルを選択されたトレーニングセットと比較し、サンプルがそのトレーニングセットの範囲内に収まる場合は陽性結果(「合格」)となります。一方、範囲外の場合は陰性結果(「不合格」)となります。各脂肪酸サンプルごとに検証モデルを作成し、それぞれのモデルを各サンプルに対してテ

ストすることで、装置は常に正しいサンプルを「合格」と判定し、類似しているものの異なるサンプルは「不合格」と判定できることが確認できます。さらに、検証結果は解釈が容易です(表2参照)。例えば、パルミチン酸は、設定された95%信頼区間内にあるという33.1%の信頼度で合格しています。

S A M P L E S	TRAINING SETS					
		<i>Palmitic Acid</i>	<i>Stearyl Alcohol</i>	<i>Lauric Acid</i>	<i>Myristic Acid</i>	<i>Stearic Acid</i>
	<i>Palmitic Acid</i>	PASS 0.331	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000
	<i>Stearyl Alcohol</i>	FAIL 0.000	PASS 0.628	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000
	<i>Lauric Acid</i>	FAIL 0.000	FAIL 0.000	PASS 0.127	FAIL 0.000	FAIL 0.000
	<i>Myristic Acid</i>	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	PASS 0.494	FAIL 0.000
	<i>Stearic Acid</i>	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	PASS 0.365

表 2. 各サンプルとトレーニングセットとの照合結果（合格および不合格）

結論

同定は、スペクトルに大きな違いがあるサンプルを特定する際に有用であり、一方で検証は、スペクトル特性が類似しているサンプルを調べる際に有効です。未知のサンプルに対しては、相関解析を用いて既知の材料のライブラリから該当するものを検索し、未知物の同定を試みます。サンプルの真正性を確

認する必要がある場合は、p値による検証が最適です。検証の「合格」および「不合格」の結果は、サンプルの同定に対してより確実な確認を提供します。一方、同定の場合は、非常に類似したサンプル間で高い一致度が得られる可能性があるため、その解釈には注意が必要です。

CONTACT

メトロームジャパン株式会
社
143-0006 東京都大田区平
和島6-1-1
null 東京流通センター アネ
ックス9階

metrohm.jp@metrohm.jp

装置構成



MIRA P Advanced

Metrohm Instant Raman Analyzer (MIRA) Pは、迅速な非破壊的計測および薬品有効成分や賦形剤などの様々な物質の検査に使用できる、高性能な携帯型ラマン分光計です。サイズはコンパクトですが、MIRA Pは非常に堅固で、弊社独自の軌道ラスタースキャン技術 (Orbital Raster Scan Technologie, ORS) を備えた作業効率の高い分光技術構造を有しています。MIRA PはFDA規則 21 CFR Part 11の要件を満たしています。

Advanced Packageには、物質を直接、またはオリジナル容器で分析することが可能なアタッチメントレンズ (レーザークラス3b)、およびガラスバイアル中のサンプル分析のためのバイアルホルダーアタッチメント (レーザークラス1) が含まれています。



MIRA P Basic

The Metrohm Instant Raman Analyzer (MIRA) P is a high-performance, portable Raman spectrometer used for rapid, nondestructive determination and verification of different material types, such as pharmaceutical APIs and auxiliary materials. Despite the small size of the instrument, the MIRA P is highly ruggedized and features a high-efficiency spectrograph equipped with our unique Orbital-Raster-Scan (ORS) technology. The MIRA P complies with the directives of FDA 21 CFR Part 11 in their entirety. MIRA P Basic package allows the user to customize the MIRA P to meet their needs. The MIRA P Basic package is a starter package that contains the basic components required for operating the MIRA P. The Basic package contains the MIRA calibration/verification accessories, the USP library, and the LWD attachment for analyses in bottles or bags. Laser Safety Class 3B operation.



MIRA P Flex

The MIRA P Flex package allows users to customize MIRA P to meet their needs. The Flex package includes the basic components needed to operate the MIRA P without sampling attachments. At least one sampling attachment is required for operation. The MIRA P Flex package includes the USP library, calibration/verification accessories, and a USB cable. Class 3B operation.