動的光散乱法による液体中の粒子径測定法

2 本測定法は、動的光散乱法(Dynamic light scattering)を用いて、液体中に分散したサブミクロン粒子の平均粒 子径及び粒子径分布を測定する方法である. 3

本法で求められる平均粒子径及び粒子径分布は、乳濁性注射剤、懸濁性注射剤、リポソーム製剤などのコロイド分 散系の製剤を中心にその特性を示す重要な因子の一つである.

動的光散乱法には、検出した信号の解析方法の違いにより、光子相関法(Photon correlation spectroscopy)と周 波数解析法 (Frequency analysis) があり、粒子径が数 nm から約 1 μm まで、又は沈降の影響が認められるまでの 粒子に適用される.

1. 原理

1

4

5

6

7 8

9

10

11

12

13

16

22 23

溶液や懸濁液中でブラウン運動をしている粒子にレーザー光を照射すると、粒子からの散乱光には拡散係数に応じ たゆらぎが生じる。大きな粒子は動きが遅いので散乱光強度のゆらぎは緩やかであり、一方、小さな粒子は動きが速 いので散乱光強度のゆらぎは急激に変化する。動的光散乱法ではこの拡散係数を反映した散乱光のゆらぎを検出し、 ストークス・アインシュタイン式を利用して粒子径を測定する.

$$d = \frac{kT}{3\pi\eta D} \times 10^{12}$$

15 d: 粒子径(nm)

k: ボルツマン定数(1.38×10⁻²³ J·K⁻¹)

17 T: 絶対温度(K) 18 η: 粘度(mPa·s) D: 拡散係数 $(m^2 \cdot s^{-1})$ 19

20 光子相関法では、この散乱光の時間的な変化(ゆらぎ)すなわちその散乱光強度の信号を相関計に送る. 相関計で 処理したデータに基づいて算出された散乱光強度の自己相関関数から、平均粒子径及び多分散指数が得られる。 21

周波数解析法では、この散乱光強度の信号に含まれている周波数成分をフーリエ変換することにより周波数の強度 分布を算出し、平均粒子径及び多分散指数が得られる.

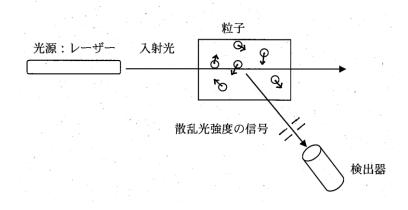


図1 測定原理の概略図

24 25

27

28

29

30

31

26 本測定法で用いる主な用語を示す.

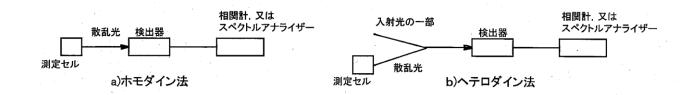
- (i) 平均粒子径 (average particle diameter): 散乱光強度基準による調和平均粒子径 (直径) であり、単位は、 ナノメートル (nm) とする.
- (ii) 多分散指数 (polydispersity index) : 粒子径分布の広がりを示す無次元指標である.
- (iii) 散乱体積(scattering volume):受光光学系と入射レーザー光で決まる観測体積である.この値は,装置の 仕様に記述されていることがある. 一般的には 10⁻¹²m³オーダーである.
- 32 (iv) カウントレート (count rate): 光子相関法で,受光光学系で検出される1秒間当たりの光子パルス数であり, 検出した散乱光強度に比例する.単位は、cps (count per second) とする. 33
- (v) 散乱光ゆらぎ信号:周波数解析法で,受光光学系で検出される信号であり,検出した散乱光強度に比例する. 34 35 粒子径分布に依存する周波数成分を含む.

36 2. 装置

37

2.1. 装置の構成

38 一般的な測定装置の主要な構成は、レーザー、試料ホルダー、受光光学系及び検出器、相関計又はスペクトルアナ 39 ライザーからなる。また、光学配置の違いにより、散乱光のみを計測する a)ホモダイン法と、散乱光と入射光の一部 40 を同時に計測する b)ヘテロダイン法の 2 種類がある.



42

45

48

49 50

51

52 53

5455

56

57

58 59

60 61

62

63

64

65

66 67

68 69

41

図2 散乱計の光学配置の違い

- 43 (i) レーザー: 単色のレーザーで, 入射光軸と受光光学系の軸とのなす面に垂直な電界成分をもつ偏光(垂直偏44 光)となるように設置する.
 - (ii) 試料ホルダー:±0.3℃以内の精度で温度を測定及び制御できる試料ホルダーである.
- 46 (iii) 測定セル: 光学ガラス又は光学プラスチック製の直方体又は円柱の容器で、試料ホルダーに取り付ける. 試料 47 ホルダーと一体化した装置もある.
 - (iv) 受光光学系及び検出器:90°から180°のある単一散乱角で、試料からの散乱光を集光し、光子パルス(デジタル信号)に変換する光学系及び検出器である。検光子を含む場合は、垂直偏光の透過率が最大になるように検光子を設置する。
 - (v) 相関計: ある時間内に入ってくる光子パルス数から自己相関関数を算出する装置である.
 - (vi) スペクトルアナライザー: 散乱光ゆらぎ信号に含まれている周波数成分をフーリエ変換することにより周波数の強度分布を算出する装置である.
 - (vii) 演算装置:相関計で算出された自己相関関数から、又はフーリエ演算された周波数の強度分布から、粒子径分布を求めるために用いるデータ処理装置で、相関計やスペクトルアナライザーの機能を有するデータ処理装置もある.

2.2. 装置のバリデーション及び再現性

動的光散乱法により得られた粒子径は、標準粒子から算出された相対的な値ではなく、基本原理に基づいた絶対的な値であるので、校正は不要である.

しかし、装置を設置したとき、又は装置の動作に疑いがある場合には、粒子径が既知の粒子を用いて、性能の確認を行うことが必要である。また、その後少なくとも1年の経過ごとに性能の確認を行うことが望ましい。

粒子径が既知の粒子として,動的光散乱法による測定で平均粒子径が約 100nm と値付けされた,粒子径分布の狭いポリスチレンラテックス粒子を使用する.この粒子の平均粒子径の測定値は,値付けされた粒子径範囲から 2% 内でなければならず,その再現性については,相対標準偏差が 2%未満でなければならない.また,多分散指数の測定値は,0.1 未満でなければならない.

3. 測定

3.1. 分散媒の選択

分散媒は、次の要件をすべて満たすものを選ぶ.

- (i) 使用するレーザーの波長に対して吸収を認めない.
- 70 (ii) 装置に用いられている材質に腐食などの影響を与えない.
- 71 (iii) 粒子に対して溶解, 膨潤, 凝集などの影響を与えない.
- 72 (iv) 粒子と異なった屈折率をもつ.
- 73 (v) 屈折率及び粘度が, 0.5%以内の精度で既知である.
- 74 (vi) 測定に支障のない清浄レベルである.

75 3.2. 測定セルの洗浄

76 必要なセル洗浄の程度は測定条件によって異なる.

個別に包装された使い捨ての清浄なセルを用いる場合は、清浄な圧縮空気でダストを吹き飛ばす程度でよい. 厳密 77 にセルを洗浄する場合は、あらかじめ水でセルを十分すすぎ、研磨剤を含まない洗剤で洗う. 78

79 3.3. 試料の調製

- 多重散乱光の影響を排除するために、ある濃度範囲の試料を調製する必要がある.また、測定に影響を与えるダス 80 81 トを除去し、調製中の再混入を防止することが重要である.
- 試料を振るとダストを含む空気が取り込まれるとともに、空気が溶液に溶け込む、目に見えない小さな気泡は、測 82
- 83 定したい試料粒子よりも、大きな散乱を与える.一度調製した試料は、決して強く振らず、試料をゆっくりと回すこ
- とが必要である. 濃縮された試料の液滴に希釈液を加える方が, 希釈液に液滴を滴下するより, 均一な試料液を迅速 84
- に作ることができる. 85

3.4. 測定手順

86

99

101

- 87 装置の電源を入れ、暖機運転をする.
- 通常、レーザーの強度が安定し、試料ホルダーが所定の温度に達するまで、約30分が必要である. 88
- 適切な分散媒を選定し,必要に応じて分散媒からのカウントレート又は散乱光ゆらぎ信号の振幅値を記録する. 89
- 粒子が分散した試料を装置内に入れ、試料の温度が試料ホルダーの温度と平衡になるまで待つ. 温度を±0.3℃ 90 以内の精度で制御し、測定することが望ましい. 91
- 予備測定を実施して、5.2.に基づいて粒子濃度を適切な範囲に設定する. 92 4)
- 93 各試料に対して,適切な測定時間又は積算回数を設定し測定する. 5)
- 94 6) 測定ごとに平均粒子径と多分散指数を記録する.
- 測定値に粒子濃度依存性が見られた場合には、無限希釈濃度へ外挿した平均粒子径及び多分散指数の値(又は 95 96 最低粒子濃度での測定値)を採用する.
- 測定終了時に, 試料中に顕著な沈殿物が認められないことを確認する. 沈殿物が認められた場合は, 凝集又は 97 析出が生じた試料であるか、動的光散乱法による測定に適していない試料である可能性がある。 98
 - 同一試料溶液につき、測定は少なくとも3回繰り返す. 9)

100 3.5. データの再現性

平均粒子径の再現性は、相対標準偏差が5%未満でなければならない.

4. データ解析 102

103 測定対象となる分散液に、単色かつ可干渉な光を照射する、分散した粒子は、ブラウン運動しているため個々の粒 子からの散乱光の位相が変動する. それらの和(干渉結果)として, 観測される散乱強度は, 時間的に揺らぐ. この 104 105 散乱光強度のゆらぎを時系列データとして解析すると, 分散した粒子の運動に関する情報が得られる.

光子相関法における解析は、散乱光強度の自己相関関数から行う.この相関関数は、時間差(相関時間)にだけ依 106 存し、測定を始める時刻には依存しない. 散乱体積中でブラウン運動している多数の単分散粒子に対して、散乱光強 107 度の自己相関関数は、基本的に相関時間の指数減衰関数である。また、多分散指数は、減衰定数の分布を示すパラメ 108 109 ータであり、粒子径分布の広がりを示す尺度である.

周波数解析法における解析は、散乱光強度から算出された周波数の強度分布から行う.この周波数の強度分布の大 110

- 111 きさは散乱光強度と試料濃度に比例し、特性周波数は粒子径に反比例する. 減衰定数と特性周波数は、ブラウン運動
- している均質な球形粒子の並進拡散係数と関係付けられ、分散媒中に分散された球形粒子では、相互作用がなければ 112
- 113 拡散係数は、ストークス・アインシュタイン式によって粒子径と関係付けられる。周波数解析法における多分散指数 は、散乱光強度基準の粒子径分布から粒子径分布の広がりを計算したもので、光子相関法の多分散指数と一致しない 114
- 115 場合もある.
- データの記録には平均粒子径及び多分散指数のほか,測定原理(光子相関法,周波数解析法),光学配置(ホモダ 116
- 117 イン、ヘテロダイン)、測定角度、測定温度、分散媒の屈折率及び粘度、測定時間又は積算回数、並びに試料濃度を
- 118 記載する.

123

5. 測定に際しての留意点 119

- 120 5.1. 粒子の形状
- 動的光散乱法のデータ解析において, 粒子は均質でかつ球形を前提にしている. 121

1225.2. 測定濃度

- 測定に際しては、以下に示す条件を満たす濃度範囲の試料を調製する必要がある.
- (i) 試料は、分散媒及びその中によく分散した粒子からなる. 124
- (ii) 粒子濃度の範囲は、主に適宜段階的に希釈し、粒子径の測定結果に変化が認められない範囲の濃度を見極めて 125 126 決定することが望ましい.

5.3. 分散媒の清浄化 127

4 074-1109.pdf

- 128 試料の希釈に用いる分散媒からの散乱光信号は、通常認められないか又は非常に弱くなければならない.次の
- 129 (i)(ii)のような場合には分散媒中あるいは試料中に粒子状物質が混入している可能性が高いため,分散媒を使用前に
- 130 更に清浄化する等(ろ過,蒸留等)の措置をとる必要がある.濃度の下限は主に、分散媒及び汚染物質からの散乱光
- 131 に影響されない条件から決定する. なお、水を分散媒として用いる場合、新鮮な蒸留水(石英ガラス製蒸留装置を用
- 132 いて作る.) 又は脱塩し、ろ過した水(例えば、孔径 0.2μm のフィルターを用いる.) の使用が推奨される.
- 133 (i) カウントレート,又は散乱光ゆらぎ信号の振幅値において,異常に強い信号を伴う大きなゆらぎが記録される 134 場合.
- 135 (ii) 試料を通過するレーザー光中に輝点が出現する場合.
- 136 5.4. その他
- 137 (i) 粒子が強く帯電して、長距離の粒子間相互作用が測定結果に影響する場合は、その影響を低減させるために、
- 138 分散媒に微量の塩(例えば,塩化ナトリウム濃度;10²mol/L程度)を含有してもよい. 139 (ii)装置のバリデーションに使用するトレーサブルなポリスチレンラテックス粒子は市販されている.
- 140 参考文献
- 141 JIS Z8826:2005 粒子径解析—光子相関法
- 142 ISO 13321: 1996 Particle size analysis Photon correlation spectroscopy
- 143 ISO 22412 : 2008 Particle size analysis Dynamic light scattering (DLS)
- 144
- 145