

3.07 動的光散乱法による液体中の粒子径測定法

次のように改める。

本試験法は、三業局方での調和合意に基づき規定した試験法である。
三業局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

動的光散乱(DLS : Dynamic Light Scattering)法は、液体中に分散されたサブミクロンサイズの粒子に対して、平均流体粒子径とその分散の程度を決定するのに使用することができる。粒子径分布は、懸濁剤、乳剤、又はリポソーム製剤などの分散系における重要な特性である。DLS法は、サブミクロンサイズの流体粒子径を測定するのに使用することができ、それゆえ、粒子径がおおよそ1ミクロンまでのランダムに動く粒子からなる分散系の粒子径解析に特に適している。なお、本測定法はISO22412 : 2017に準拠したものである。

1. 原理

液体中に分散されたサブミクロンサイズの粒子は、沈降することなく、ブラウン運動として知られる常にランダムな動きをしている。これらの粒子にレーザー光が照射されると、動いている粒子により散乱された光の強度は、粒子の拡散係数に応じて変動する。大きな粒子は動きが遅いので、大きな粒子による散乱光強度の揺らぎは緩やかであり、一方、小さな粒子による散乱光強度の揺らぎは短時間で変化する。DLS法では、この拡散係数に依存した散乱光強度の揺らぎが測定されて、解析される。並進拡散係数と球相当粒子径は、ストークス・アインシュタイン式によって関係づけられている。

$$x = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

x : 球相当粒子の流体粒子径(m)
 k : ボルツマン定数($1.38 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$)
 T : 絶対温度(K)
 η : 分散媒の粘度(Pa·s)
 D : 並進拡散係数($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

散乱光の強度変動は、経時的な位相シフト又はスペクトル周波数のシフトで評価できる。

これらの考えに基づき、経時的な散乱光強度は、光子相関(PCS : Photon Correlation Spectroscopy)法か周波数解析法かのいずれかにより処理される。

PCS法では、経時的な散乱光強度は、それ自身を時間的にずらした波形との相関をとる(自己相関)あるいは他の検出器から得られた信号との相関をとる(交差相関)。粒子分散系の自己相関関数及び交差相関関数は、相関時間の増加と共に相関値が減衰する。この減衰は指数関数的である。減衰率は、散乱光の粒子サイズに応じた揺らぎ(大粒子ではゆっくり、小粒子では速く揺らぐ)によって決まる。

周波数解析法では、散乱光の周波数のパワースペクトルを解析する。試料が粒子分散系ならば、パワースペクトルはローレンツ型の関数で記述される。

この二つの手法は、数学的に等価である。つまり、周波数解析法のパワースペクトルは、PCS法における自己相関関数を

フーリエ変換したものに一致する。このため、どちらの手法を用いても、平均粒子径(\bar{x}_{DLS})と粒子径分布の分散の程度を反映した多分散指数(PDI)が求められる。

データの評価には、異なる数学的手法が用いられる。例えば、粒子径分布の評価には逆ラプラス法が用いられ、自己相関関数の評価にはキュムラント法が用いられる。

DLS式測定装置に使われている光学検出方法は三つのタイプがある。散乱光のみを検出するホモダイン法、散乱光と入射光を干渉させて検出するヘテロダイン法、及びホモダイン法による測定を二つ同時に実施する交差相関法である。

2. 装置

一般的な測定装置は、以下の構成となる。

(i) レーザー : 単色かつ可干渉性のあるレーザーで、入射光軸と受光光学系の軸とを含む面に対して、垂直な電場成分をもつ偏光(垂直偏光)となるように設置する。測定セル内の試料を照射する。

(ii) 試料ホルダー : 試料の温度を適切な範囲内(例えば、 $\pm 0.3^\circ\text{C}$)に保つために使用する。

(iii) 光学系及び検出器 : ヘテロダイン検出又は交差相関法で用いられるビームスプリッター、入射レーザー光に対して一定の角度に配置された検出器(通常、単一散乱角について実施)により、適切なサンプリングレートでみかけの散乱光強度が測定される(このみかけの散乱光強度は、測定されたサンプリングタイムにおける、散乱体積中全粒子からの散乱光の合計である)。検光子を含む場合、検光子は垂直偏光の透過率が最大になるように設置される。

(iv) 相関計(光子相関法の場合)又はスペクトルアナライザー(周波数解析法の場合)

(v) 演算装置及びデータ処理ソフトウェア(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。)

3. 装置の性能の管理/適格性確認

DLS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、粒子径が認証された試料を用いて、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年ごとに性能の確認を行うことが望ましい。

認証された標準物質については、DLS法又は可能なら電子顕微鏡で検証済みの適切な平均粒子径のものの使用が推奨される。100 nm程度又はその他適切な粒子径で、狭い粒子径分布を持つポリスチレンラテックス粒子が用いられる。

平均粒子径の測定値は、認証値との差が2%以内でなければならない。キュムラント法では、多分散指数の測定値は0.1以下であり、少なくとも5回連続測定したときの相対標準偏差は2%以下でなければならない。

4. 手順

4.1. 試料調製

(i) 試料は、分散媒中によく分散した物質からなる。分散媒は、次の要件を全て満たすものを選ぶ。

- 使用するレーザーの波長に対して吸収を認めない。
- 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。
- 粒子に対して溶解、膨潤、凝集などの影響を与えない。
- 試験物質と異なった既知の屈折率をもつ。

104 e 測定温度における粘度が±2%以内の精度で既知である。
105 f ほこりなどによる粒子汚染がなく、バックグラウンド散
106 乱が低く、測定に支障のない清浄レベルである。

107 (ii) 多重光散乱の影響を除去するため、濃度は適切な範囲に
108 収めなければならない。粒子濃度の範囲(特に上限)は、粒子径
109 の測定結果に濃度の影響が認められないことを確かめることが
110 適切である。段階的に希釈した試料の測定結果に基づき分析の
111 前に決定することが望ましい。濃度の下限は主に、分散媒及び
112 汚染物質からの散乱光に影響されない条件から決定する。試料
113 の希釈に用いる分散媒からの散乱光ノイズは、通常検出されな
114 いか又は非常に弱くなければならない。

115 また、測定に影響を与えるダストを除去し、調製中の再混入
116 を防止することが重要である。もし異常に強い信号を伴う大き
117 な揺らぎが記録される場合や、試料を通過するレーザー光中に
118 輝点が出現する場合においては、混入した異物又は塊状粒子が
119 試料に含まれている可能性が高い。そのような場合、分散媒を
120 使用前に更に清浄化する措置(ろ過、蒸留など)をする必要があ
121 る。

122 なお、水を分散媒として用いる場合、新たに蒸留した水又は
123 脱塩してろ過(例えば、孔径0.2 µmのフィルターを用いる)した
124 水の使用が推奨される。

125 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
126 影響することもある。その際には影響を低減するために、分散
127 媒に微量の塩(例えば、塩化ナトリウム濃度; 10⁻² mol/L程度)
128 を添加してもよい。また、冷蔵保存していたサンプルを室温で
129 測定する場合には、測定セル中で気泡が生じる可能性があるた
130 め、注意する必要がある。

131 測定値に粒子濃度依存性が見られた場合には、濃度範囲がそ
132 の試料において適切であるか確認する。

133 4.2. 測定手順

134 装置の電源を入れ、暖機運転をする。

135 必要に応じてセル洗浄を行う。洗浄の程度は測定条件によっ
136 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
137 合は、そのまま使用することもできる。セルを洗浄する場合は、
138 水あるいは有機溶剤でセルをすすぐ。必要に応じて、研磨剤を
139 含まない洗剤を用いてもよい。

140 試料の入ったセルを試料ホルダー内に入れ、試料の温度が試
141 料ホルダーの温度と平衡になるまで待つ。温度を±0.3°C以内
142 の精度で制御し、測定することが望ましい。

143 予備測定を実施して、4.1.試料調製の項に記載の通り、粒子
144 濃度を適切な範囲に設定する。

145 適切な測定時間と積算回数を設定し、測定する。

146 1回の測定ごとに平均粒子径と多分散指数を記録する。

147 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
148 確認する。沈殿物が認められた場合は、凝集又は析出が生じた
149 試料であるか、DLS法による測定に適していない試料である
150 可能性がある。

151 4.3. データの再現性

152 本試験法で得られる再現性は、主に試料の特性(懸濁剤/乳
153 剤、分散安定性、粒子径分布の分散の程度など)に依存するが、
154 要求される再現性は測定のために依存する。(異なる試料の調
155 製における)再現性は物質によって大きく異なることから、本
156 項においてその必須要件を定めることはできない。しかし、少
157 なくとも3回測定した際の平均粒子径(\bar{x}_{DLS})の相対標準偏差が

158 10%以下といった、再現性の許容基準を目標とすることが望
159 ましい。

160 5. 結果の記録

161 試験の記録には、平均粒子径と多分散指数を記載しなければ
162 ならない。

163 また、使用した分散媒とその屈折率及び粘度、及び試料温度
164 等について記載し、測定系についての十分な情報として、例え
165 ば、測定原理(PCS法又は周波数解析法)、光学的配置(ホモダ
166 イン又はヘテロダイン)、レーザー波長及び観測角度などの測
167 定装置に関する情報を記載する。それに加えて、測定時間又は
168 積算回数、試料(性質、濃度及び調製法)、分散条件、装置の設
169 定及び測定セル型に関する情報も記載すべきである。結果は、
170 データ解析プログラムにも依存するため、それらの詳細につい
171 ても記載する必要がある。

172 6. 用語

173 (i) 平均粒子径(Average particle diameter) \bar{x}_{DLS} : 散乱光強
174 度基準による調和平均粒子径(直径)であり、単位は、メートル
175 (m)とする。 X_{DLS} は一般的にz平均又はキュムラント径とも呼
176 ばれる。

177 (ii) 多分散指数(Polydispersity index) PI: 粒子径分布の分散
178 の程度を示す無次元指標である。

179 (iii) 散乱体積(Scattering volume): 入射レーザー光により照
180 射され、検出器により測定可能な試料の体積である。一般的に
181 は10⁻¹²m³オーダーである。

182 (iv) 散乱光強度(Scattered intensity), カウントレート(count
183 rate): 散乱体積に存在している粒子によって散乱された光の
184 強度(散乱光強度)である。PCS法では、単位時間当たりの光子
185 パルス数(カウントレート)であり、1秒あたりのカウント数で
186 表される。周波数解析法では、散乱光強度に比例する、光検出
187 器からの電流値で表される。

188 (v) 粘度(Viscosity) η : 分散媒の粘度であり、単位は、パス
189 カル秒(Pa·s)とする。

190 (vi) 屈折率(Refractive index) n : レーザー光の波長における
191 分散媒の屈折率を示す無次元指標である。

192