

## 解説

## 等温熱量測定による医薬品の安定性評価

三村尚志, 北村 智, 幸田繁孝

(受取日: 1998年9月14日, 受理日: 1998年9月21日)

## Evaluation of Drug Stability by Isothermal Microcalorimetry

Hisashi Mimura, Satoshi Kitamura and Shigetaka Koda

(Received September 14, 1998, Accepted September 21, 1998)

The application of isothermal microcalorimetry to the drug stability was investigated. Studies of reaction and decomposition kinetics under various conditions were deduced from the shapes of the heat flow curves, and the activation energy of the decomposition was determined from Arrhenius plots. The decomposition mechanisms of drugs in the presence of oxygen, water and an additive were also studied and the utility of this technique to evaluate the solid-state stability of drugs was demonstrated. Consequently, it is expected that the use of isothermal microcalorimetry would provide a direct, rapid and simple method of assessing drug stability.

## 1. 序 論

医薬品の安定性評価は、品質保証における重要な評価項目であり、ICH (International Conference of Harmonization) で合意されたガイドライン<sup>1)</sup>に準拠した申請用安定性試験の他、前臨床から市販後にかけての各段階で多様な安定性試験が実施される。医薬品の安定性予測は、Arrhenius式を用いた速度論的解析が一般的であるが、加速条件下における試料の残存率の変化を経時的に測定する必要があり、多大な時間と労力を要する。さらに、研究開発の初期段階においては、数多くの開発候補品の安定性を少量の試料量で、しかも短期間に評価する必要があることから、効率的な評価が要求される。

一方、熱重量測定 (TG) や示差走査熱量測定 (DSC) などの熱分析法による評価法も、簡便かつ短期間に安定性を評価する手法として応用されている。<sup>2)</sup> これらの手法は、非等温的測定における重量減少曲線や発熱曲線から分解を速

度論的に解析し予測するものや、DSC 曲線パターンの変化から原薬と賦形剤の配合変化を予測するものである。しかし、これらは、高温域で起こる分解を解析対象とする場合が多く、分解機構が変化してしまう場合には、室温付近の安定性を正確に予測できない欠点がある。

これらの熱分析による安定性評価に対し、近年、高感度の等温微量熱量計を用いた安定性評価に関する多くの報告がなされている。<sup>3-8)</sup> この等温熱量測定を応用した安定性評価は、液体クロマトグラフ法などを用いた従来の評価法に比べ、簡便で短期間の評価が可能であるだけでなく、より室温に近い温度条件で評価できるため、信頼性の高い安定性予測を行うことができる等の特長を有している。また、化学的な分解反応だけでなく、非晶質原薬の結晶化のような物理的変化の反応解析についても、熱量測定の応用が試みられている。<sup>9)</sup>

本報では、医薬品開発における多種多様な安定性試験に等温熱量測定を応用し、(1) 分解機構の解明、(2) 原薬の

藤沢薬品工業(株) 物性研究所: 〒532-8514 大阪市淀川区加島 2-1-6

Analytical Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Kashima 2-1-6, Yodogawa-ku, Osaka 532-8514, Japan

© 1998 The Japan Society of Calorimetry and Thermal Analysis.

安定性に及ぼす水分の影響、(3) 製剤中の主薬の安定性に及ぼす賦形剤の影響などについて検討した結果を示し、安定性評価法としての特徴と有用性について論述する。

## 2. 等温微量熱量計の仕様および測定方法

等温熱量測定は、CSC 製 等温熱量計 (4224 型 4 セルタイプ; 恒温槽安定性,  $\pm 0.0005^\circ\text{C}/24\text{ h}$ ; ベースライン安定性,  $\pm 2.0\ \mu\text{W}/24\text{ h}$ ; ベースラインノイズ,  $\pm 0.2\ \mu\text{W}$ ; 検出限界,  $0.5\ \mu\text{W}$ ) を用いた。熱量の校正は、各測定温度ごとに内蔵ヒーターを用いて行った。

測定に用いた試料は、いずれも藤沢薬品工業(株)で製造されたセフジニル (経口セフェム剤), FK409 (NO 産生剤),  $\alpha$ 型セファメジンナトリウム (注射用セフェム剤) および硫酸セフォセリス (注射用セフェム剤) を用い、それらを内容積 2~40 ml のガラスバイアルに一定量充填した後、ゴム栓およびアルミニウムキャップを用いて巻き締め、密栓したものをを用いた。なお、ガラスバイアル上のラベル、油性インク等、測定に影響を与える恐れのあるものは除いた。また、必要に応じ、バイアル内のヘッドスペースを窒素あるいは酸素で置換した。

測定は、試料バイアルをあらかじめ測定温度下で約 30 分間保存した後、測定セル内にロードすることにより開始した。また、測定後の試料は、必要に応じ、水分測定 (カールフィッシャー法)、定量 (液体クロマトグラフ法) などの試験を行った。

## 3. 結果および考察

### 3.1 分解機構の解明

固体状態における分解反応に対し、Hansen らは、等温熱

量測定により得られる熱流曲線の速度論的解析を目的とし、次式のような一般式を報告している。<sup>4)</sup>

$$0\text{次速度式 } dQ/dt = -\Delta H\beta D_0 k = \text{constant} \quad (1)$$

$$\text{一次速度式 } dQ/dt = -\Delta H\beta D_0 k (1-\alpha) \quad (2)$$

$$\text{自触媒速度式 } dQ/dt = -\Delta H\beta D_0 k \alpha^{1-x} (1-\alpha)^{1-y} \quad (3)$$

ここで、 $dQ/dt$  は熱流量、 $\Delta H$  は分解熱、 $\beta$  は試料中のイニシャル薬物量、 $D_0$  は試料量、 $k$  は分解速度定数、 $\alpha$  は分解率である。

#### 3.1.1 分解機構の温度依存性

任意の保存温度における分解速度は、加速温度条件下における分解速度定数を求め、Arrhenius 式を用いる外挿法により予測できる。しかし、安定性予測を外挿法により行う場合、目的とする温度と加速試験を行う温度で分解機構が変わらないことが前提となる。

そこで、経口セフェム剤であるセフジニルにつき、分解機構に及ぼす温度の影響を調べる目的で、各種温度で等温熱量測定を行った (Fig.1)。<sup>10)</sup> その結果、セフジニルは、 $30^\circ\text{C}\sim 50^\circ\text{C}$  では 0 次速度式 (1) に従った熱流曲線を示すのに対し、 $70^\circ\text{C}$  では測定開始直後に大きな発熱変化を示した後、次第に減衰する曲線を示し、 $30^\circ\text{C}\sim 50^\circ\text{C}$  とは異なる分解機構を示すことが示唆された。

また、0 次速度式 (1) に従う分解では  $dQ/dt$  が速度定数  $k$  に比例することから、Arrhenius 式 (4) は (5) 式のように書き換えられる。

$$\ln k = \ln A - E_a/RT \quad (4)$$

$$\ln dQ/dt = \ln A' - E_d/RT \quad (5)$$

ここで、 $E_a$  は分解の活性化エネルギー、 $A$  および  $A'$  は頻度因子、 $R$  は気体定数、 $T$  は絶対温度である。そこで、Fig.1 から求められる  $30^\circ\text{C}\sim 50^\circ\text{C}$  における  $dQ/dt$  の平衡値を  $1/T$  に対し対数プロットしたところ、Fig.2 に示すように、 $1/T$  と  $\ln dQ/dt$  に良好な直線関係が認められた。したがって、セフジニルの安定性予測においては、同一の 0 次反応機構で分解することが認められた  $50^\circ\text{C}$  以下の温度で加速試験を行う必要がある。なお、Fig.2 の直線の傾きから、分解の活性化エネルギーは  $51.9\ \text{kJ mol}^{-1}$  と求められた。

このように、等温熱量測定法を応用することにより、分解機構の温度依存性を従来法と比較して、簡便に、しかも短期間で評価できることが確かめられた。

#### 3.1.2 自触媒分解の解析

医薬品には、自らの分解生成物が分解の触媒 (反応核) となり分解を加速させる自触媒分解を示すものがある。このような自触媒分解を起こす医薬品の中には、自触媒分解の前段階に、反応核の生成に要するラグタイムを示すものが多い。したがって、液体クロマトグラフ法により経時的

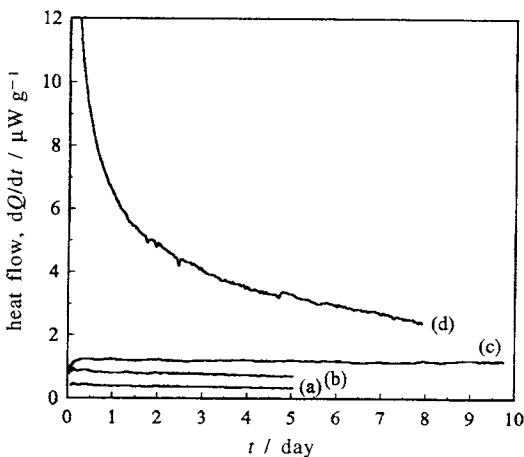


Fig.1 Heat flow curves for cefdinir at various temperatures. (a),  $30^\circ\text{C}$ ; (b),  $40^\circ\text{C}$ ; (c),  $50^\circ\text{C}$ ; (d),  $70^\circ\text{C}$ .

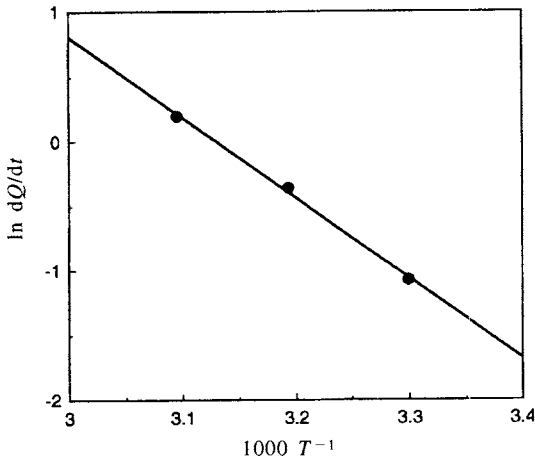


Fig.2 Relationship between  $1/T$  and  $\ln dQ/dt$  for cefdinir.

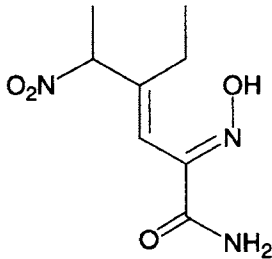


Fig.3 Chemical structure of FK409.

に残存率を測定する方法の場合、0次や一次反応に従う場合と比べ、測定時点数を多くする必要がある。さらに、ラグタイムの分解を0次速度式や一次速度式などに近似して安定性子測を行うと、予測結果に大きな誤差を与える可能性がある。

一方、等温熱量測定においては、連続的な熱量変化の測定が可能であることから、自触媒分解におけるラグタイムの有無や期間の評価、および(3)式を用いた熱流曲線の速度論的解析を正確かつ簡便に行うことができる。<sup>11)</sup>

NO産生剤FK409 (Fig.3)は、液体クロマトグラフ法を用いた安定性評価結果から、自触媒機構に従い分解することが推察された。そこで、FK409の等温熱量測定を60℃で行い、その分解機構を確認するための検討を行った。Fig.4に、不純物プロファイルの異なる3ロットのFK409につき、等温熱量測定を行った結果を示す。その結果、いずれのロットも、ほとんどエンタルピー変化のないラグタイムを示した後、自触媒分解に特徴的な発熱ピークを与えることが確かめられた。一方、熱量測定後の試料につきESR測定を

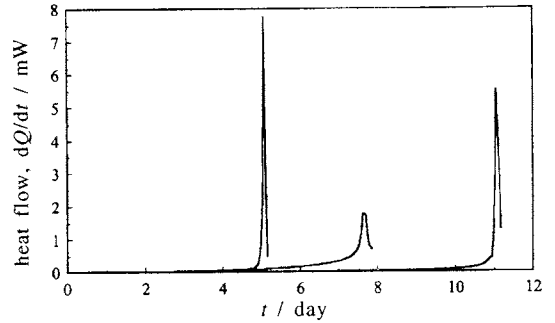


Fig.4 Heat flow curves for three different lots of FK409 at 60℃.

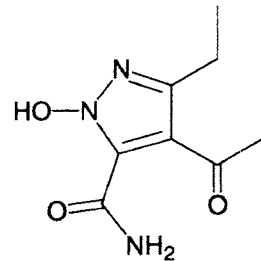


Fig.5 Chemical structure of impurity A included in FK409 drug substance.

行った結果、有機ラジカルの存在が明らかとなった。これらの結果から、FK409の固体状態における分解がラジカル分解により進行することが確認され、その反応機構を等温熱量測定により簡便に解析できることが確かめられた。

次に、Fig.4において、ロット間でラグタイムに差のあることが確認されたことから、各ロットの不純物プロファイルとラグタイムとの相関を調べた。その結果、FK409に含まれる不純物A (Fig.5)の量が多い程、ラグタイムが短いことが判った。したがって、原薬中の不純物Aの含量を少なくすることにより、FK409の安定化が図られるものと考えられた。

さらに、ラジカル連鎖分解の開始を抑制することにより、FK409を安定化できる可能性が考えられたことから、ラグタイムに及ぼす酸素濃度の影響を調べた。実験は、測定バイアル内の空気を酸素あるいは窒素で置換したものについて、60℃で等温熱量測定を行い、それらの熱流曲線パターンを比較することにより行った。その結果、Fig.6に示すように、酸素<空気<窒素の順で酸素濃度が低くなる程ラグタイムが短く、酸素がラジカルスカベンジャーとして作用することが判った。

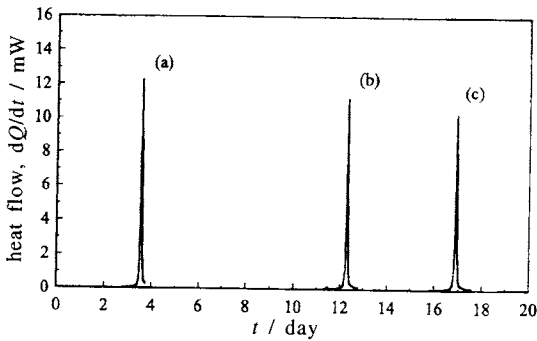


Fig.6 Heat flow curves for FK409 under various atmospheres at 60°C. (a), nitrogen; (b), air; (c), oxygen.

このように、等温熱量測定により得られる熱流曲線から、FK409のような自触媒分解を起こす医薬品に対し、それらの安定性に及ぼす不純物や酸素濃度の影響を極めて明確に示すことができた。

### 3.2 原薬の安定性に影響を及ぼす水分の影響

医薬品原薬に含まれる水分は、付着水と結晶水とに大別される。原薬表面に吸着した付着水は、加水分解を促進する吸着水層を形成するため、不安定化の要因となる。<sup>12)</sup> 一方、結晶水は、結晶構造の安定化に寄与していることから、結晶水の存在状態が変化すると安定性は低下する場合がある。<sup>13)</sup> したがって、原薬の安定性に及ぼす水分量あるいは水分の存在状態の影響を正確に把握することは、原薬および製剤の製造工程の設計や保存条件の設定などに対して重要である。

注射用セフェム剤であるα型セファゾリンナトリウム(5水和物)に含まれる水分は、湿度変化に対し容易に吸脱着する性質を有する。<sup>14)</sup> そこで、種々の水分量となるよう調湿したα型セファゾリンナトリウムにつき、40°Cにおける等温熱量測定を行い、水和量と安定性の関係を調べた。その結果、Fig.7に示すように、4.2～4.5水和状態付近から、熱流曲線パターンおよびエンタルピー変化量が著しく変化することが認められ、水分量の低下に伴い安定性も低下することが予測された。

次に、各試料を40°Cでさらに6ヶ月間保存した試料につき、液体クロマトグラフ法により残存率を求め、その結果とFig.7から得られたエンタルピー変化量の関係を調べた。Fig.8から明らかなように、両者には良好な相関が認められ、24時間の等温熱量測定により、従来の方法で数ヶ月を要した評価とほぼ同様の結果を得られることが確認された。

### 3.3 製剤中の主薬の安定性に及ぼす賦形剤の影響

錠剤形成のための結合剤や崩壊剤、あるいは用時溶解型

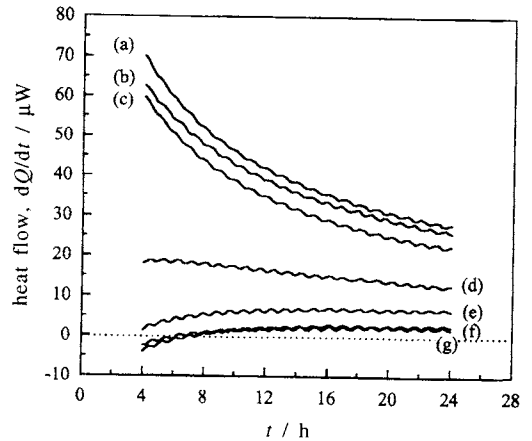


Fig.7 Heat flow curves for α-form cefazolin sodium at different moisture levels at 40°C. (a), 4.13; (b), 4.19; (c), 4.35; (d), 4.46; (e), 4.57; (f), 4.70; (g), 5.00 mol/mol.

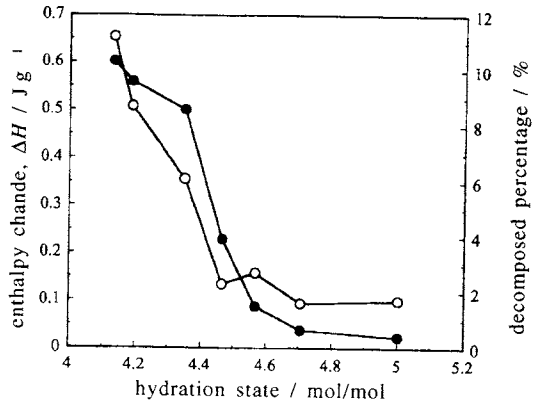
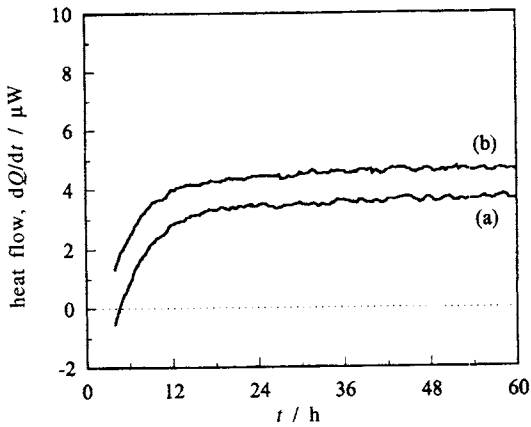


Fig.8 Relationship between microcalorimetric data for α-form cefazolin sodium at 40°C for 24 hours and HPLC data at 40°C for 6 months. ●, enthalpy change during 4-24 hours. ○, decomposed percentage after storage at 40°C for 6 months.

の注射剤における溶解補助剤などの賦形剤の配合は、製剤中の主薬の安定性に影響を及ぼす場合がある。このような配合変化試験への等温熱量測定の実用性を検討する目的で、注射用セフェム剤である硫酸セフェキシムと溶解補助剤であるL-アルギニンとの配合変化試験を行った。

原薬と原薬に対しL-アルギニンを2:1で配合して得られた製剤につき、40°Cにおける等温熱量測定を行った。その



**Fig.9** Heat flow curves for cefoseris sulfate drug substance and drug product at 40°C. (a), drug substance; (b), drug product (cefoseris sulfate: L-arginine = 2:1).

結果, Fig.9に示すように, 製剤の方がわずかに大きいエンタルピー変化を示し, L-アルギニンの配合により主薬の安定性がわずかに低下することが示唆された。

次に, 原薬および製剤を50°Cで3箇月保存した後, 分解物の生成様式の違いを液体クロマトグラフ法により調べた。その結果, いずれの試料においても, 液体クロマトグラム上に10種の分解物由来のピークを認めたと, 製剤では, そのうちの2種の分解物がわずかに多く生成していることが確かめられた。この2種の分解物はアルカリ溶液中で特異的に生成する分解物と液体クロマトグラム上で一致した。したがって, 硫酸セフォセリス製剤においては, 主薬の表面に形成された吸着水層に主薬およびL-アルギニンが溶解し, アルカリ溶液に近い条件下で分解が生じていることが推察された。

以上の結果を参考に, 硫酸セフォセリス製剤の安定化を図る目的で, 水分量を一定量以下に制御する製造法が確立されている。

#### 4. 結 論

医薬品の安定性評価に対する等温熱量測定の実用性を検討した結果, 測定により得られる熱流曲線パターンを解析することにより, 液体クロマトグラフ法などの煩雑な定量操作が必要である従来法よりも, 種々の分解機構を簡便に特定できることが確かめられた。また, 医薬品原薬の安定性に及ぼす水分などの影響, あるいは製剤設計を行う上で重要である賦形剤との配合変化試験などについても, 従来法に比べ簡便かつ効率的に評価できることが確かめられた。

したがって, 医薬品開発の初期段階における安定性スクリーニングや, 原薬の製造工程を変更した場合の安定性の同等性確認, あるいは, 工場生産品の品質管理としての安定性試験を実施する上で, 等温熱量測定が非常に有効であると考えられる。

#### 文 献

- 1) ICH Harmonized Tripartite Guideline, Endorsed by the ICH Steering Committee at Sep 4 of the ICH Process (1993).
- 2) J. L. Ford and P. Timmins, *Pharmaceutical Thermal Analysis: Techniques and Applications*, Ellis Horwood, Chichester (1989).
- 3) M. Angberg, C. Nystrom and S. Castensson, *Acta Pharm. Suec.* **25**, 307-320 (1988).
- 4) L. D. Hansen, E. A. Lewis, D. J. Eatough, R. G. Bergström and D. DeGraft-Johnson, *Pharm. Res.* **6**, 20-27 (1989).
- 5) G. Buckton and A. E. Beezer, *Int. J. Pharm.* **72**, 181-191 (1991).
- 6) X. Tan, N. Meltzer and S. Lindenbaum, *Pharm. Res.* **9**, 1203-1208 (1992).
- 7) M. J. Koenigbauer, *Pharm. Res.* **11**, 777-783 (1994).
- 8) L. D. Hansen, *Pharm. Tech.* **APRIL**, 64-74 (1996).
- 9) Y. Aso, S. Yoshioka, T. Otsuka and S. Kojima, *Chem. Pharm. Bull.* **43**, 300-303 (1995).
- 10) H. Mimura, S. Kitamura, Y. Okamoto and T. Yasuda, *Drug Stability* **1**, 34-39 (1995).
- 11) L. D. Hansen, D. J. Eatough and E. A. Lewis, *Can. J. Chem.* **68**, 2111-2114 (1990).
- 12) L. J. Leeson and A. M. Mattocks, *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* **47**, 329-333 (1958).
- 13) S. Kitamura, A. Miyamae, S. Koda and Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.* **56**, 125-134 (1989).
- 14) T. Osawa, M. S. Kamat and P. P. DeLuca, *Pharm. Res.* **5**, 421-425 (1988).

#### 要 旨

医薬品の品質を保証する上で, 安定性試験は重要な評価項目である。そこで, 医薬品の安定性評価を, 分解に基づく微小なエンタルピー変化を検出可能な高感度等温熱量計を用いて検討した。その結果, 等温熱量測定を応用することにより, 分解機構の速度論的解析の他, 安定性に及ぼす酸素, 水分および賦形剤の影響を, 液体クロマトグラフ法などの煩雑な定量操作を必要とする従来法に比べ, 短期間かつ簡便に評価できることが確かめられた。

解 説

## 結晶性医薬品の熱的評価と X線回折-DTA同時測定装置の開発

芦澤一英

(受取日1998年8月31日, 受理日: 1998年9月14日)

### Characterization of Crystalline Pharmaceuticals and Development of Simultaneous Measurement System of X-ray Diffraction and DTA

Kazuhide Ashizawa

(Received August 31, 1998, Accepted September 14, 1998)

The molecular details and phase transition of drug crystal were studied by thermal analysis, combination of other measurements and simultaneous measurements of X-ray diffraction (XRD) and DTA systems. In the crystalline state, methosorbiniol have been shown to exist in two polymorphic crystalline forms,  $\alpha$ - and  $\beta$ -form crystals by DSC and infrared spectroscopy. Transformation from the  $\beta$ - to  $\alpha$ -form was observed at various heating rates, which were enhanced by the presence of a small amount of  $\alpha$ -form crystals. Cefclidin has been shown to exist in three pseudopolymorphic crystalline forms,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -form crystals by X-ray diffractometry. The relationship between the pseudopolymorphic crystal forms of cefclidin and water content was studied by X-ray diffractometry, moisture analysis and vacuum freeze drying experiments. The phase transition of crystalline cefclidin clearly indicated the effect of water content on dehydration. In studying phase transition of pseudopolymorphism of E4031 and E3060, XRD-DTA system technique which describe characterization of the phase transition of pseudopolymorphism has been developed. The present study clarified the phase behavior of pharmaceuticals with thermodynamics, and spectroscopic, and newly XRD-DTA system technique.

#### 1. はじめに

本稿は結晶性医薬品の結晶多形 (polymorphism) と疑似結晶多形 (pseudopolymorphism) について、他測定を併用した熱的評価と新規開発したX線回折 (XRD)-DTA同時測定装置の利用について紹介することを目的とした。

医薬品は構造が複雑なるが故に、特に原薬が固体の場合

には、非晶質形を含め、結晶多形や水和物結晶等による疑似結晶多形の出現率が高く、多くの医薬品でこの現象が認められている。多形には安定形と準安定形があり、準安定形は熱力学的に高いエネルギー状態にあり、高い溶解度を示す。非晶質形固体はさらに高いエネルギー状態にある。このような、結晶多形や疑似結晶多形などの分子状態の差が、医薬品の溶解性、物理的および化学的性質を決定し、