

熱測定を利用した医薬品化合物の 結晶/非晶質物理状態評価

川上 亘作

(受取日:2009年11月18日, 受理日:2009年12月23日)

Thermal Analysis of Physical State of Crystalline/Glassy Pharmaceuticals

Kohsaku Kawakami

(Received Nov. 18, 2009; Accepted Dec. 23, 2009)

Molecular conformation/arrangement of active pharmaceutical ingredients and excipients in the solid state has great impact on physicochemical characteristics of the formulations including solubility and stability. Although various methodologies are available for their investigation, thermal analysis has great advantages in terms of its high sensitivity and flexibility. In this paper, thermal analysis for the evaluation of polymorphism and amorphous state is described from practical viewpoint in the pharmaceutical industry.

Keywords: Polymorphism, Transition Temperature, Amorphous, Relaxation

1. はじめに

近年の医薬品候補化合物は、水に対する溶解性に問題を抱えることが多い。その原因としてよく指摘されるのは、合成技術の向上による化合物の複雑化・高分子量化と、創薬戦略の変化である。1.2)昔の創薬研究は、初期段階から直接生体や細胞などで薬効評価を行っていたため、物性に難のある化合物は自然に淘汰されていた。しかし近年の創薬研究においては、作用機序の仮説に基づいて分子を3次元的にデザインし、レセプターや酵素などとの相互作用によって初期スクリーニングを行っており、この手法では相対的に難水溶性化合物が生き残りやすい。低溶解性は経口吸収性の低さの原因となることが多く、これは製剤の生産コスト増大に繋がるとともに、何らかの事情で予想以上に吸収された場合には、安全性の点で問題が起こるかもしれない。

溶解性が低い場合には、結晶多形による溶解度変化が重要な意味を持つ。結晶多形にまつわるトラブルとしては、

Ritonavir の事例が有名である。3) 1996年に製品化された本化合物は、1998年まで何の問題もなく240ロットの生産を行ったが、突如さらに安定な結晶形が出現し、もとの結晶形は生産不能となった。これらの結晶形の間には4~5倍の溶解度差があったため、本化合物は結局、製剤の回収と再開発を強いられる結果となった。結晶多形については特許係争も非常に多く、開発する結晶形以外にどのような結晶形が存在するか、できる限り把握することが望ましい。もちろん逆の立場から見れば、結晶多形をうまく利用すれば、先発品より優れた製品が開発できる可能性もある。

また非晶質は結晶よりも溶解性に優れるため、難水溶性薬物の製剤化手段として有用である。2.4.5) しかしながら、緩和や結晶化などの非晶質の構造変化については未解明の点が多く、有用性が初めて報告されてから既に50年近くが経過しながら、非晶質状態の経口製剤への利用は未だ限定的である。

結晶多形や非晶質製剤の医薬品開発過程における評価手段として、熱分析は極めて有用な手段となる。まず他の分

光学的手法などと比較すると、一般的に感度の点で優れる。また評価の柔軟性が極めて高いため、評価者の創意工夫によって様々な問題解決が可能となる。これは例えば、示差走査熱量測定において、サンプル量や昇温速度を変えただけでも異なる結果となり得ることからも明らかである。以下、熱分析を駆使した結晶多形と非晶質の評価について、とくに医薬品開発における実用的な観点に着目して紹介を行う。

2. DSC による結晶転移評価

医薬品開発の中で複数の結晶形が発見された場合、それ らの熱力学的関係についての情報は極めて重要であり、と くに室温付近における最安定形を特定する必要がある。こ れは、製造再現性や保存安定性の観点から、最安定形を採 用するのが無難なためである。また準安定形を採用する場 合には、結晶転移が起こる条件や転移の速度について、理 解しなければならない。ふたつの結晶形間の熱力学的関係 は、モノトロピー型とエナンチオトロピー型に分けること ができる(Fig.1) 6。モノトロピー型においては、全ての 温度範囲において、物理的安定性の順列が変わることはな い。Fig.1(A) では、I型がII型よりも常に安定な例を示し ている。I型の自由エネルギーおよびエンタルピーは、融点 以下において、常にII型のそれらよりも低い。従って、II 型から1型、すなわち準安定形から安定形への転移が、見か けの転移温度 Tel-IIにて起こる場合には、発熱が起こる。一 方, エナンチオトロピー型転移においては, 物理的安定性 の順列は、転移温度を境に入れ替わる。Fig.1(B)では、低 温でⅠ型が、高温でⅡ型が安定な例を示している。転移温度 T.I-IIで各々の自由エネルギーの高さは入れ替わるが、ここ で低温安定形から高温安定形の転移が起こる場合は、図に 示す通り、これは吸熱過程となる。ただし、実際には必ず しも熱力学的転移温度で転移が観察されるとは限らず、さ らに高い温度に見かけの転移温度が観察されることもある。 場合によっては転移は起こらず、低温安定形の融点が観察 されることもある。また同様に、高温安定形を冷却しても、 転移温度以下で低温安定形が得られるとも限らない。DSC で観察された転移温度が熱力学的転移温度、すなわち各結 晶形の自由エネルギーが等しくなる温度と一致しない場合 には,速度成分も反映されているため,昇温速度依存性を 持つことになる。Fig.2に、DSC上の転移温度が熱力学的 転移温度と一致する Tolbuta mide と, 一致しない Sulfamerazine のサーモグラムを示す。6) いずれの場合も, 昇温途中に転移挙動が吸熱ピークとして観察される。しか しながら、Tolbutamideの転移温度は昇温速度に関わらず 常に同じ温度で観察されている一方で、Sulfamerazineの転 移温度は昇温速度とともに変化する。Tolbutamide はこの

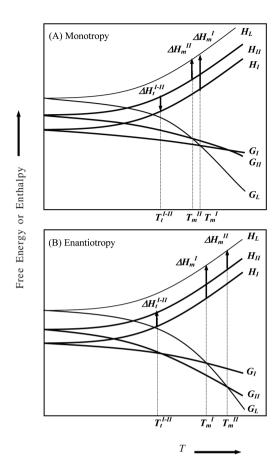


Fig.1 Free energy (G), enthalpy (H) - temperature (T) diagrams of (A) monotropically or (B) enantiotropically related transitions. Superscript or subscript I, II, I-II, and L mean form I, form II, forms I-II transition, and liquid state, respectively. Form I is the stable form in the case of the monotropic transition, and the stable form at lower temperature in the case of enantiotropic transition. ΔH_t and ΔH_m are the enthalpies of polymorphic transition and fusion. T_t and T_m are the transition and the melting temperatures.

温度が熱力学的転移温度であるが、Sulfamerazineの転移温度は60~70℃程度にあり、DSC測定においては、それよりも100℃以上高い温度で転移が観察されている。降温測定を行うと、Tolbutamideは同じ温度で発熱ピークが観察されるが、Sulfamerazineの場合は転移が起こらず、高温安定形が低温まで維持される。従って、昇温速度を変えた測定や降温測定を行うことによって、観察された転移温度が熱力学的な転移温度と一致しているかどうかを判別できる。

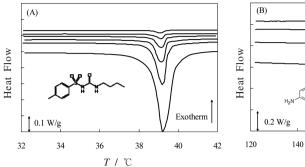
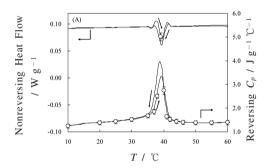


Fig.2 DSC thermograms of the polymorphic transition of (A) tolbutamide and (B) sulfamerazine obtained on TA Q1000 (TA Instruments, DE, USA). The heating rates were 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, and 5 °C min⁻¹ (top to bottom) for tolbutamide and 2.5, 5, 10, and 20 °C min⁻¹ (top to bottom) for sulfamerazine, respectively. The chemical structure of each compound is shown in the figure.



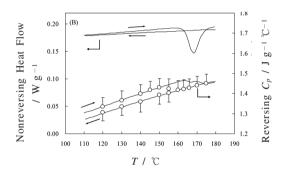


Fig.3 Modulated-temperature DSC measurements of (A) tolbutamide and (B) sulfamerazine on TA Q1000. Samples were heated or cooled at 2 $\,^{\circ}$ C min⁻¹ with a 60 sec period and 0.75 $\,^{\circ}$ C amplitude to separate the reversing C_p (heat capacity) from the nonoreversing heat flow. After reaching 70 $\,^{\circ}$ C (tolbutamide) or 180 $\,^{\circ}$ C (sulfamerazine), the temperature was held for 3 minutes and then decreased. Open circles are the heat capacity values obtained in the quasi-isothermal experiments. The standard deviations of three runs were indicated by error bars.

温度変調型DSCでこれらの転移を観察した結果が、Fig.3 である。っTolbutamideの転移ピークは可逆成分として観察されるが、Sulfamerazineの場合は不可逆成分として観察されており、温度変調型DSCもこれらの差別化に有用であることが分かる。

DSC上の転移温度が熱力学的な転移温度でない場合,別の手法によって熱力学的な転移温度を求めなければならないが,それらは大変手間のかかるものである。しかしDSC測定時に微量の溶媒を添加して転移を媒介することにより,熱力学的な転移温度を推測できることが分かった。Fig.4はSulfamerazineに30%アセトニトリル水溶液を微量滴下したサンプルを用いて,DSC測定を行った結果である。8 乾燥状態では160~180℃で観察されていた転移温度が,100℃以下にまで低下していることが分かる。転移温度を

熱力学的転移温度に近付けるには、昇温速度が遅いほど、また溶解度が高い溶媒を使うほど有利であり、 1 Ch^{-1} で昇温が可能な等温カロリメータを用いると、転移温度は80 C以下まで下げることができる。 $60 \sim 70 \text{ Ch}$ に存在する熱力学的転移温度まで完全に一致させることは容易ではないが、大まかに推測するためには有用な手法である。

3. 水和化合物の熱分析

医薬品化合物は様々な形態で溶媒と相互作用を持つが、 とくに水との相互作用については、原薬の品質保証や溶解 性への影響の観点から、詳細な把握が必要である。相互作 用形態は、まず単純な物理吸着である吸着水と、結晶格子 に取り込まれる結晶水のふたつに大きく分けることができ、 さらに結晶水は、結晶格子形成に直接関わる格子水、格子

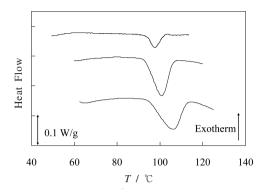


Fig.4 DSC thermograms of sulfamerazine form II with an addition of a drop of acetonitrile/water = 3/7 to about 10 mg of the solid. Samples were heated from 40 ℃ at 1, 3, or 5 ℃ min⁻¹ (top to bottom) on Thermo Plus DSC8240 (Rigaku Denki, Tokyo, Japan).

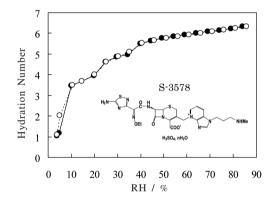


Fig.5 Water sorption/desorption isotherm of S-3578 at 25 °C acquired on IGAsorp moisture sorption analyzer (Hiden Analyticals, London, UK). The sorption processes are shown as closed symbols and connected by solid lines. The desorption processes are shown as open symbols and connected by dashed lines. The chemical structure of S-3578 is shown in the figure.

の隙間に侵入する層間水,格子内に閉じ込められるクラスレートに分類される。以下,これらの相互作用形態が共存する場合の評価例を紹介する。9)

S-3578 は吸湿性の高い化合物であり、常温・40%RHで約5水和物となる。Fig.5 は、吸湿による重量変化の相対湿度依存性である。常温・常圧においては、3%RHでも本化合物は1水和物であり、強固に結合した水が存在することが分かる。また5%RHから10%RHにかけて急激な重量増

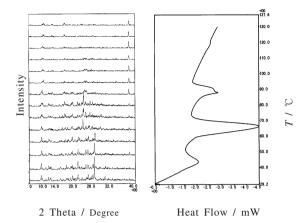


Fig.6 XRD-DSC measurement of S-3578 performed on the Rigaku RINT 2000 X-ray Diffraction System with Thermo Plus II DSC unit (Rigaku Denki, Tokyo, Japan). The heating rate was 2 ℃ min⁻¹. The diffraction peak at 38.5 ℃ is due to the aluminum sample pan.

が観察されるが、これは格子水が取り込まれるときの典型 パターンである。それ以上に湿度が上昇すると、水和数は 漸増する。5水和物をX線-DSC同時測定に供した結果が Fig.6である。DSC曲線より水が3段階で脱離していること が分かるが、TG測定より、低温側から順に2水、2水、1 水相当の重量減を伴うことが分かっている。脱水時のX線 回折パターンの変化に注目すると、はじめの2水の脱離で はほとんどパターン変化は認められないが、幾つかの回折 ピークが昇温とともに少しずつ広角度側にシフトしている。 これは格子面間隔が少しずつ狭まっていることを示唆して おり、この2水は層間水であると推測される。以降の2水、 1水脱離時には、いずれも回折パターンが大きく変化して おり、これらの水は結晶格子形成に直接関わっている格子 水であると考えることができる。以上の結論は、湿度を変 化させた粉末X線回折や、固体NMR 測定からも支持され るものであった。なお10%RH以上で観察される緩やかな ステップ状の重量増は、層間水流路における立体障害であ ると推測された。

4. 赤外サーモグラフィを用いた 多検体同時熱分析システム

近年の医薬品開発においては、開発結晶形を決定するための多形スクリーニングが行われることが多い。これは96ウェルプレート内で様々な条件で晶析を行って結晶形を評価するものであり、粉末 X線回折、ラマン分光、複屈折測定など様々な分析手段が96ウェルプレートに対応している。ところが、一連の分析の中で唯一対応できていない項目が

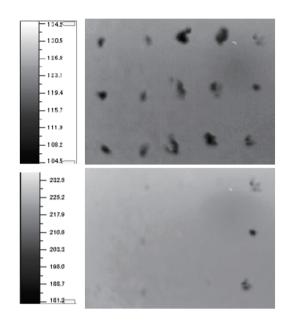


Fig.7 Thermal images acquired by an infrared camera, FSV 7000E (Apiste, Osaka, Japan). Indomethacin (melting temperature, 173 ℃), mannitol (176 ℃), carbamazepine (190 ℃), griseofulvin (221 ℂ), and sulfamerazine (234 ℂ) (left to right, n=3) were heated at 15 ℂ min⁻¹ on a programmed hot plate (Hot Plate DEMO LS15P, Hakko, Nagano, Japan). Numbers in the left column were temperatures. Initially, surface temperature of each sample was lower than the plate (upper). After reaching the melting temperature, the surface temperature became equal with the plate temperature (lower).

熱分析である。赤外サーモグラフィが2次元熱分析の強力なツールとなることは既に知られているが,100 その特長を活かせば96 検体の同時測定も可能であると考え,多検体同時熱分析への可能性を検討した。

Fig.7 は、昇温速度を約15℃ min-1に制御したホットプレート上に配置された、各種モデル薬物のサーモグラフィ像である。薬物は固体状態では熱伝導性が悪いため、その表面温度は周囲温度よりも低い。しかし融解によって熱伝導性が上昇し、液化後は周囲と同じ温度となる。Fig.8 に、Indomethacinの表面温度を示す。表面温度は融解開始とともに急激に上昇し、融解が終わると再びプレートの昇温速度と同じ傾斜に戻るため、急激な温度上昇の終点を融点(173℃)と捉えることができる。現状、鮮明に観察が行えるのは融点のみであるが、原理上は多形転移や脱水なども観察が可能であり、今後は改良を進める予定である。

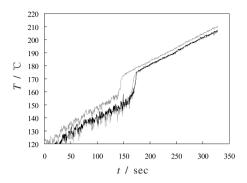


Fig.8 Surface temperature of indomethacin observed by the infrared camera (n=3). Dramatic increase in the surface temperature was observed during the melting. The melting temperature can be determined from the end point.

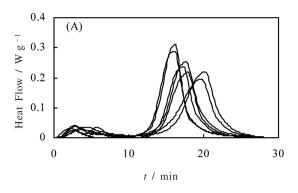
5. 構造緩和の熱分析

非晶質は非平衡状態にあるため、経時的にその構造を変化させ、エネルギー的により有利な状態を獲得しようとする。その過程は構造緩和と呼ばれる。任意時間tにおける(準安定ガラスに対する)過剰エンタルピー H_{ex} は、次に示すKohlrausch-Williams-Watts (KWW) 式で表現される。<math>11,12)

$$H_{ex} = H_{ex0} \exp \left[-(t/\tau)^{\beta} \right], \quad 0 < \beta \le 1$$
 (1)

ここでτは緩和時間と呼ばれる減衰定数であり、分子運 動性の指標となる。βは経験的に導入されたフィッティン グパラメータ、 H_{ex0} は調製直後 (t=0) における過剰エン タルピーである。非晶質の構造緩和研究において、熱分析 はもっとも有用な評価手段のひとつである。緩和実験から 定量化される分子運動性は、製剤の化学的・物理的安定性 と相関する事例が多く報告されている。5) またそれを利用し て、アニーリングによる非晶質製剤の安定化が達成される こともある。通常のDSC以外にも、温度変調型DSCII)や等 温カロリメータ11-13)は強力な評価手段となる。温度変調型 DSC は緩和エンタルピーの定量を容易にすることが大きな 特長であり、等温カロリメータは既に熱履歴を有する検体 をそのまま評価できるほか、「緩和エンタルピー」を直接観 察できる(DSC法では「回復エンタルピー」の観察から 「緩和エンタルピー」を類推するため)という大きな長所を 持つ。以上のさらなる詳細は本誌で過去に紹介している。12)

緩和時間は多くの場合温度のみの関数として扱われるが、 非晶質構造への依存性も非常に大きい。すなわち緩和時間



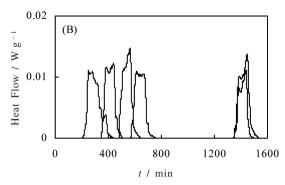


Fig.9 Heat flow generated during the isothermal crystallization of Imwitor 742 at (A) $-14\,^{\circ}\text{C}$ or (B) $0\,^{\circ}\text{C}$ on DSC (TA O1000).

は、温度のみの関数ではなく、時間の関数でもある。我々のシミュレーション結果からは、100時間のアニーリングの間に、緩和時間は2桁以上大きくなる可能性があることが分かった。 11 非晶質医薬品に関する研究のほとんどは、緩和時間を温度のみの関数として取り扱っているため、これは論文間における値の不一致の原因ともなる。例えば非晶質Indomethacinの 30 でにおける緩和時間は、Hancockらの実験 14 では40時間程度と報告されているが、我々の検討 11 では9時間となった。これはHancockらの検討がアニーリング実験を最長16時間まで行っているのに対し、我々の実験では6時間を最長としていたという点で説明がつく。このような不一致は、緩和時間 12 ではなく 12 での比較を行うことによって解消される。 11

6. 医薬品化合物の結晶化速度解析

非晶質医薬品を採用するためには、保存中に結晶化が進行しないことを保証しなければならない。また添加剤成分についても、それが非晶質(液体)か結晶かによって製剤のパフォーマンスが大きく変わってしまう。結晶化過程は通常、核形成と結晶成長に分けて考えられるが、実験で容易に直接観察できるのは後者のみであり、粉末X線回折またはDSCを用いて評価されることが多い。一般にDSC法の方が定量性に優れ、その解析には様々なモデル式が検討されるが、Avrami-Erofeev式が最も良いフィッティング結果を与えるケースがほとんどである。

Fig.9 は,カプリル酸とカプリン酸のモノ・ジ・トリグリセリド混合物である Imwitor 742 の等温結晶化過程を,DSCで観察した結果である。 15 Imwitor 742 の融点は室温付近であるため,いずれの温度条件も過冷却液体状態であり,これらの温度では安定形の β 型(β 型も混在)に結晶化する。-10 $^{\circ}$ $^{\circ}$ 以下の低温条件においては結晶化学動の再現性は良好であるが,それ以上の高温条件では,結晶成長が

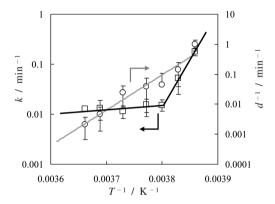


Fig.10 Temperature-dependence of crystallization rate *k* (circles) and induction time *d* (squares).

始まるまでの時間,すなわち誘導期間の再現性が低下した。 Fig.10 は,結晶化速度定数と誘導期間の温度依存性である。 前者は結晶成長過程,後者は核形成過程を反映していると 解釈できる。結晶化速度定数は−10℃以上ではほぼ一定と なるため,高温になるほど結晶化過程は誘導期律速,すな わち核形成速度律速となった。医薬品の保存安定性の観点 から,結晶化時間を冷蔵条件(5℃)と室温条件(25℃) に外挿したところ,それぞれ46時間,40ヶ月となることが 分かった。ただし誘導期間の再現性が低いことから,実際 にはさらなる安定化が必要である。医薬品の安定性は年単 位で保証する必要があるため,結晶化の律速過程は通常は 核形成過程となる。しかしながら,それを実験的に予測す る手法は確立されておらず,その発展が非晶質医薬品の積 極的な利用のためには急務である。

6. おわりに

以上, 医薬品化合物の結晶形・結晶転移や, 非晶質評価 手段としての, 熱分析の利用について紹介した。医薬品原 薬や製剤の物性評価には様々な分析手段が利用されることから、それぞれの評価項目に関する知識は「広く浅く」なりがちである。また、新しい評価機器が次々と開発されることから、研究者の興味の対象はどうしても新しいものに集まってしまう。しかし熱分析は評価手法に柔軟性があり、工夫によってまだまだ新しい使い方を開発できる可能性を秘めている。とくに非晶質の構造変化については、未だ良く理解されていない課題が多く残されているが、その解明に熱分析は必ず大きな貢献をするものと思われる。

謝辞

本解説は、塩野義製薬、コネチカット大学、万有製薬 (Merck & Co.)、および現職の物質・材料研究機構における研究成果をまとめたものであり、多くの方々の指導と協力によって行われました。とくにコネチカット大学のPikal 教授の指導は、非晶質の緩和研究を遂行するうえで欠かせないものでした。さらに、実験を遂行するにあたり多くの協力をいただいた塩野義製薬の井田泰夫氏、北西恭子氏、および日常からご指導いただいている東邦大学の寺田勝英教授、米持悦生准教授に感謝致します。メーカーの方々にも多くの協力をいただいており、とくにティー・エイ・インスツルメント・ジャパン、メトラー・トレド、およびアピステの方々には直接実験をサポートしていただき、ここにお礼申し上げます。

文 献

- 1) D. Brown, Drug Discovery Today 12, 1007 (2007).
- 2) K. Kawakami, J. Pharm. Sci. 98, 2875 (2009)
- 3) J. Bauer et al., Pharm. Res. 18, 859 (2001)
- 4) 川上亘作, ファームテクジャパン 20, 2099 (2004).
- 5) 川上亘作, 熱測定 35, 185 (2008)
- 6) K. Kawakami, J. Pharm. Sci. 96, 982 (2007).
- K. Kawakami and Y. Ida, *Thermochim Acta* **427**, 93 (2005)

- K. Kawakami, Y. Asami, and I. Takenoshita, J. Pharm. Sci. 99, 76 (2010).
- K. Kawakami, Y. Ida, and T. Yamaguchi, *Pharm. Res.* 22, 1365 (2005).
- 10) 橋本寿正, 森川淳子, 熱測定 33, 58 (2006).
- K. Kawakami and M. J. Pikal, J. Pharm. Sci. 94, 948 (2005).
- 12) 川上亘作, 熱測定 31, 74 (2004)
- 13) K. Kawakami and Y. Ida, *Pharm. Res.* 20, 1430 (2003).
- 14) B. C. Hancock, S. L. Shamblin, and G. Zografi, Pharm. Res. 12, 799 (1995).
- 15) K. Kawakami, Pharm. Res. 24, 738 (2007).

要旨

医薬品原薬および添加剤の固体状態における分子構造・分子配列は、製剤の溶解性や安定性などの各種物性に大きな影響を及ぼす。その評価には様々な分析手段が用いられるが、熱分析は感度の高さに加え、評価法の柔軟性が大きな魅力である。本解説においては、熱分析を駆使した結晶多形と非晶質の評価について、とくに医薬品開発における実用的な観点に着目して紹介を行う。



川上亘作 Kohsaku Kawakami 独立行政法人物質・材料研究機構 生体 材料センター

National Institute for Materials Science TEL 029-860-4424, FAX 029-860-4714 e-mail kawakami.kohsaku@nims.go.jp 研究テーマ:新規製剤技術の開発、原薬 物性評価

趣味:各種スポーツと小動物とLOHAS な生活