

自動溶解度測定装置を用いた溶解度と準安定領域の検討

井田泰夫
Yasuo IDA

創薬探索研究所医薬応用化学部門主席研究員

永松大樹

Daiki NAGAMATSU

創薬探索研究所医薬応用化学部門研究員

1 はじめに

結晶は高エネルギー状態にある非晶質と比較して、物理的、化学的に安定な状態であり、長期間の品質保持が求められる医薬品にとって優れた特性であるため、現在、医薬品の多くは結晶として発売されている。また、晶析(結晶化)は医薬品の品質向上に欠かせない分離精製的手段としても非常に優れた方法であるため、結晶は医薬品原薬としてだけでなく、合成中間体としても重要な位置付けとなっている。

一方、近年、製薬業界では新薬開発のスピードアップが必要とされてきており、開発初期段階から物性評価を行い、開発候補化合物の原薬の決定、すなわち、結晶の創製と開発形態としての結晶形を早期に選定することが必要となってきた。さらに、工業化のための効率的な結晶化方法を決定するために、結晶多形や晶析に関連するデータを収集することも開発のスピードアップに有効であると考えられる。

晶析は過飽和が推進力となって起こるものであり、過飽和状態の制御が、結晶形の分離、精製、粒子径や結晶形態などの原薬の品質に大きく影響を与える。このため、開発初期段階から晶析操作において過飽和の特性を知ることは重要と考えられるが、少量の原薬量で簡便に過飽和の特性を測定することは困難であり、実際に検討を行うことはまれである。今回、自動溶解度測定装置を用いて、溶解度および準安定領域の測定を試みたので報告する。

2 準安定領域と核発生

結晶を析出させるためには、飽和溶解度よりも高い濃度にする必要があり、この状態を過飽和という。過飽和状態では、液相における溶質の化学ポテンシャル μ_l が結晶相の化学ポテンシャル μ_s より高いため、結晶化により系の自由エネルギーを下げ方向に進み、これが結晶化の推進力となる。図1を用いて一般的な結晶化の工程を説明する。未飽和領域にある溶液(a)を冷却していくと飽和溶解度(b)に達し過飽和となるが、すぐに結晶核が発生するわけではなく、更に冷却が進んだ点(c)で結晶核が発生する。この点(c)を過溶解度という。そして、飽和溶解度の温度を T_s 、結晶核の発生する温度を T_c 、溶液(a)の濃度を C_a 、 T_c における飽和溶解度を C_d とすると、過飽和の度合いを表す表示方法としては、濃度差を用いる以下の3種の方法

$$\text{過飽和度 } \Delta C = C_a - C_d$$

$$\text{過飽和比 } S = \frac{C_a}{C_d}$$

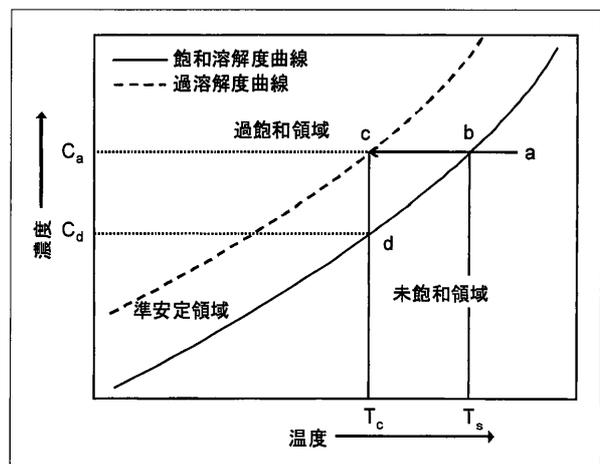


図1 飽和溶解度と準安定領域

$$\text{相対過飽和度 } \sigma = \frac{(C_a - C_d)}{C_d}$$

および、濃度の代わりに温度差を用いる方法がある。

$$\text{過冷却度 } \Delta T = T_s - T_c$$

この過溶解度を異なる濃度で複数点測定し、温度に対してプロットすると波線で示す曲線が得られるが、これが過溶解度曲線である。この過溶解度曲線と実線で示す飽和溶解度曲線に挟まれた領域を準安定領域といい、過飽和ではあるが核発生の起こらない領域とされている。しかし、過溶解度曲線は熱力学的な平衡値ではないため、測定方法によりその値が変化する。このため数値の取り扱いに難しい面もあるが、核化の速度を反映するもので核発生のしやすさを示す指標として考えることができる。

結晶の析出は核発生と結晶成長という過程を経るが、核発生には一次核発生と二次核発生がある。一次核発生は、溶液の濃度のゆらぎによって自然に結晶が発生する現象であるが、これはさらに溶液中に存在する異物や器壁などにより誘発される不均一核発生と、それらと全く無関係に起こる均一核発生に分けられる。一方、二次核発生は溶液中に存在する種晶によって誘発される現象である。均一核発生は、非平衡の過飽和溶液中で分子は会合によりクラスターを形成し、このクラスターが結晶として成長できるサイズ(臨界径 r_c)を越えたときに、安定な核が発生すると考えられている。クラスターの発生による自由エネルギー変化 ΔG は、核が球形であるとの仮定で以下の式で与えられる。

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma + \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_v$$

γ は界面エネルギー、 ΔG_v は単位体積あたりの自由エネルギー変化量である。 ΔG_v は負の値をとるため ΔG は極大を持つ関数となり、図 2 に示す関係となる。ここで ΔG が最大となる点 (ΔG_c) が、先に述べた臨界径 r_c である。発生したクラスターの半径が r_c を越えた場合 ΔG が減少に転じることから、更に半径が大きくなり結晶として成長し、一次核発生となる。一方、 r_c より半径が小さい場合は半径が減少するに従い、自由エネルギーが減少するため、再び溶解する方向に向かう。

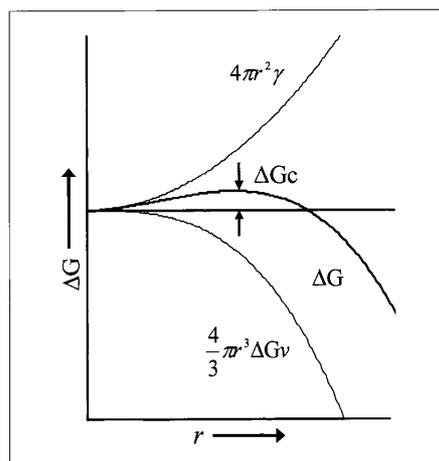


図 2 均一核発生と自由エネルギー変化

以上、準安定領域と核発生について簡単に記したが、更に詳細なことについては、優れた成書¹⁻³⁾が出版されており、それらをご一読いただきたい。

3 準安定領域の測定装置と問題点

先に述べたように、準安定領域は過溶解度曲線と飽和溶解度曲線との領域であるため、ある濃度の溶液を一定温度で冷却し核の発生する点を検出する方法により知ることができる。これを温度変化法という。そしてこの点を種々の濃度で測定し、温度に対してプロットして過溶解度曲線を得る。この核発生の検出方法として、①物理量、すなわち成長した粒子の量を測定する方法：粒子計数器や濁度計など、②濃度変化を検出する方法；FT-IR、電気伝導度、ultrasonic velocity^{*}、密度などの2つのカテゴリーに分類されている。⁴⁾ しかしながら、実際の核は非常に小さく、核の発生そのものを検出することが困難であり、実験的に検出できるのは核が成長して白濁した状態、あるいは濃度変化が起こり始める点となる。このため、検出方法により準安定領域の幅が異なってくる場合がある。実際に Marciniak⁵⁾ は trichloroethylene 中における fluoranthene の準安定領域を密度、ultrasonic velocity および濁度法を用いて測定したところ、準安定領域は検出方法に強く依存し、その幅は密度法が最も広く、次いで

* Ultrasonic velocity についての用語解説は、1012 頁参照。

ultrasonic velocity, 濁度法の順であったと報告している。

4 準安定領域の測定

準安定領域の測定には HEL 社製ハイスループット結晶化ユニット, CrystalSCAN(図3)を用いた。

本機の核発生の検出方法は濁度法が採用されており, 複数のリアクター内の濁度と温度が同時にプローブにより測定可能となることが特徴である。また, リアクターの容量は2~200 mL となり, 薬物量に応じたスケールで実験できる。ここではかく拌装置としてアンカースターラーを示しているが, 通常用いられるかく拌子(グラウンドスターラー)を用いることも可能である。基本的な測定プログラムの概略図を図4に示す。

化合物をある濃度において飽和溶解度より高い温

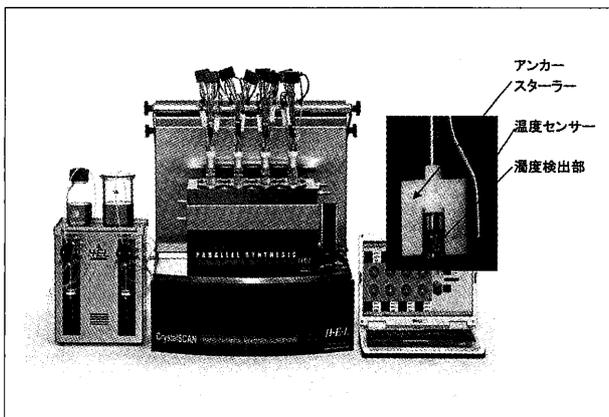


図3 ハイスループット結晶化ユニット(CrystalSCAN)

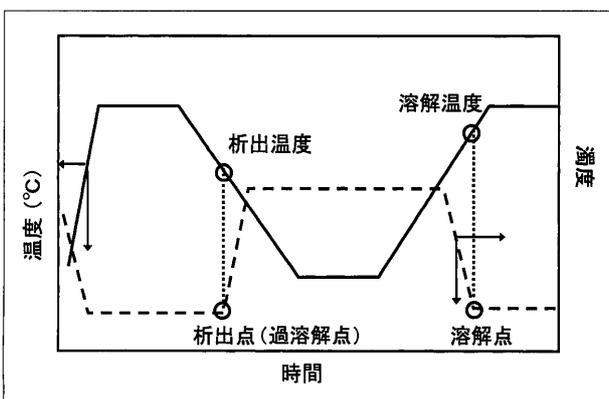


図4 測定プログラム例

度で完全溶解させた後, 一定の速度で冷却していくと, ある温度で核発生による濁度の上昇が認められ, この温度を過溶解点(析出の起こり始める点)とする。濁度の上昇が止まった(析出工程が終了)後, 再び一定の速度で加温を開始すると, 溶解に由来する濁度の低下が確認され, 完全溶解に達すると濁度の低下が止まる。この点を溶解点とし, 見掛けの飽和溶解度とする。この工程を1サイクルとし順次測定溶媒を加えて希釈することで, 種々の濃度条件での過溶解点と溶解点を自動測定することができ, 得られた各点をプロットすることで, 準安定領域を求めることができる。

初期濃度 70 mg/mL のインドメタシンを溶解させたアセトニトリル溶液(容量として 5 mL)を 1°C/min で加温・冷却, 希釈して測定したときの溶解点と過溶解点を図5に示す。過溶解度曲線と飽和溶解度曲線は平行になることが多い¹⁾と報告されているが, 今回の結果もそのことを支持していた。また別途, 15°C, 25°C, 40°C, 50°C におけるインドメタシンの飽和溶解度を実測し, 得られた実測値から計算した飽和溶解度曲線を同時に示した。これら2つの方法で測定された飽和溶解度はおおむね一致しており, 本機で求めた溶解点から, 精度よく飽和溶解度を推定できることが分かった。なお測定終了後, 析出物の粉末 X 線回折測定を行い結晶形を確認したところ, 安定形の γ 形結晶であることが確認でき, γ 形の準安定領域が得られたと考えている。

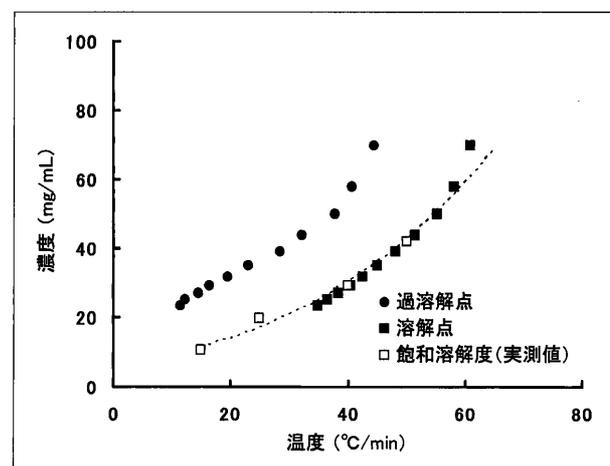


図5 アセトニトリル中のインドメタシンの溶解度と準安定領域

5 準安定領域に及ぼす諸因子の影響

準安定領域は検出方法だけでなく、種々の測定条件でも変化する。例えば冷却速度、かく拌速度やかく拌子の形状や溶液中の不純物濃度⁶⁾なども影響を与える。一般に冷却速度が高くなると準安定領域も広くなるとされており、Bonnin-Paris ら⁷⁾は水におけるグリシンの準安定領域は、冷却速度を 0.1~1.5°C/min にしたとき、7.5~16°C とほぼ2倍であったと報告している。

今回の検討では、測定溶媒を水としたときのテオフィリンの水溶液中準安定領域に及ぼす冷却速度およびかく拌速度の影響を調べた。テオフィリン濃度を 7 mg/mL (容量として 5 mL)、アンカースターラーのかく拌速度を 300 および 600 rpm とし、冷却・加温速度を 0.25, 0.5, 1, 5°C/min で測定したときの過溶解点と溶解点を図 6 に示す。過溶解点は冷却速度の上昇とともに低下し、300 rpm において冷却速度 0.25°C/min と 5°C/min では 5.4°C の差が認められた。一方、溶解点における速度による差は 0.25°C/min と 5°C/min で 3.4°C と過溶解点に比べ、速度の影響は小さかった。特に 1°C/min 以下では、その差は 0.4°C と、加温速度の影響は非常に小さいと考えられた。

また、本装置を用いて測定した 25°C における水に対するテオフィリンの溶解点は 8.2 mg/mL であ

り、文献値の 8 mg/mL⁸⁾ とよく一致した。先に、インドメタシンの準安定領域の測定において 1°C/min で昇温したときの溶解点と実測値がよく一致したことを示したが、今回の結果も含めて、昇温速度を 1°C/min 以下とすることによって得られる溶解点は、精度よく溶解度を見積もることができると考えられる。

次に過冷却度 ΔT と冷却速度の関係をかく拌速度 300 rpm, 600 rpm についてプロットした図を示す (図 7)。冷却速度が 0.25~1°C/min までは両者の ΔT はほぼ同じ値を示し、かく拌速度の影響は小さいことが示された。しかし、5°C/min では、かく拌速度の早い 600 rpm の方が過溶解点が高く、準安定領域が小さくなっており、冷却速度が速くなるとかく拌速度の影響が大きくなることが示唆された。かく拌速度の影響については Mitchell ら⁹⁾が、エタノール中の paracetamol の準安定領域はかく拌速度が速くなるに従い小さくなったことを報告しており、今回の結果を支持するものであった。

本実験で用いた装置は、かく拌方法としてアンカースターラー以外にもグランドスターラーを用いることができるため、かく拌子の違いによる影響についても検討した。グランドスターラーとして 3 種 (小; 2 mm (W) × 5 mm (H), 中; 3 mm × 10 mm, 大; 7 mm × 15 mm) を用い、アンカースターラーと同条件で過溶解点と溶解点を測定した。その結果を図 8 に示す。 ΔT はグランドスターラーの大きさに

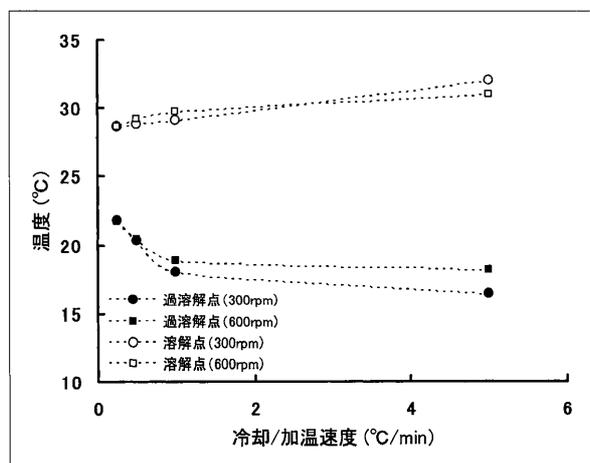


図 6 テオフィリンの溶解点、過溶解点に及ぼすかく拌速度と冷却速度の影響

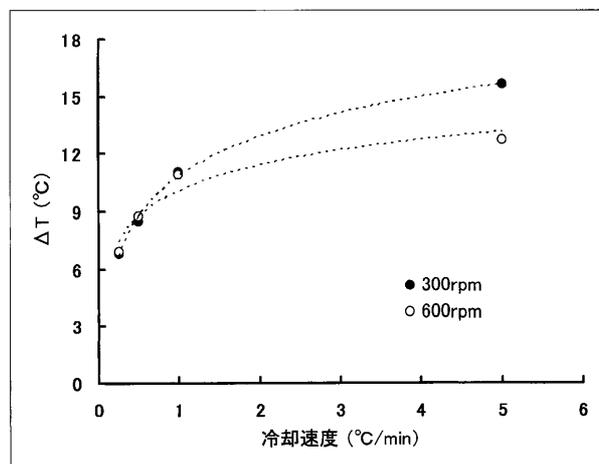


図 7 テオフィリンの準安定領域に及ぼすかく拌速度と冷却速度の影響

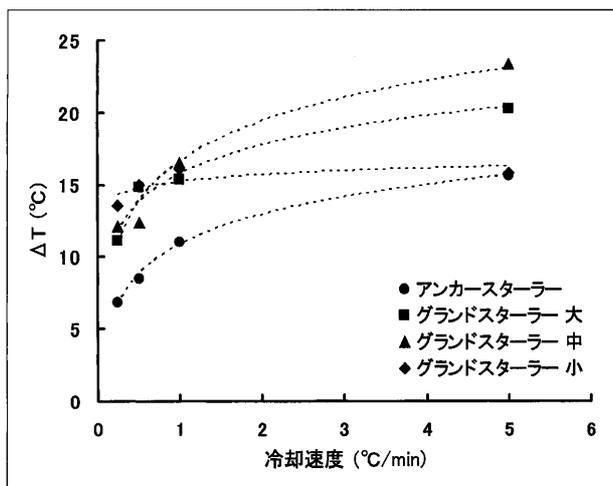


図8 テオフィリンの準安定領域に及ぼすかく拌方法の影響

関係なく、アンカースターラーより大きな値となった。データは掲載しないが、溶解点はいずれの条件においてもスターラー間に差は認められなかったのに対し、過溶解点はアンカースターラーの方が明らかに高かったことから、アンカースターラーの方が結晶化を促進していると考えられる。さらに、グランドスターラーは値にバラツキが大きく再現性も低かった。これはグランドスターラーが溶液の底部に位置するため、かく拌の均一性がアンカースターラーに比べて低いことに起因すると推定している。

以上、5 mL という小スケールで、準安定領域を自動で簡便に知ることができ、結晶化検討を行うための有用な情報を得ることができた。また、スケールアップ時の重要な要因を少量で検討することも可能と思われた。

6 おわりに

準安定領域は、19世紀に Ostwald により提案された概念で、その後 Miers により過溶解度曲線が実測され、準安定領域が実験的に示された。そして、Nyvlt¹⁰⁾による準安定領域からの核発生速度の研究が発表されるなど、古くから研究が行われてき

た。しかしながら、準安定領域の過溶解度曲線は熱力学的に非平衡な状態であり測定が難しい。また、発生した核が非常に小さいため、実際の核発生を実験で検出することが困難であるといった理由で、いまだに不明な点も多い。このため現在も、準安定領域に関する研究が精力的に行われており、Nyvltの方法に問題点も指摘されているほか、新たな提案もなされている。^{4,11,12)} また結晶化のみならず、物性改善の手段として注目を浴びている cocrystal の研究例も報告されており、Boyd¹³⁾らは benzoic acid と isonicotinamide の cocrystal (1:1) の準安定領域の研究において、過剰の benzoic acid は準安定領域を増大させるが、isonicotinamide は準安定領域を減少させたと報告している。

近年、医薬品の開発において、難溶性、複雑な結晶多形、難結晶化などの問題が増えてきており、原薬の晶析制御だけでなく、結晶に関連する諸問題の解決のために準安定領域を知ることは有用と思われる。このため、開発の早い段階から準安定領域を考慮した晶析、結晶化や結晶多形の検討を行う必要性はますます高まっていくと考える。

参考文献

- 久保田徳昭, 松岡正邦, “分離技術シリーズ5 改訂 分かり易い晶析操作,” 分離技術会, 東京, 2009, pp. 14-25.
- 北村光孝, “結晶多形のメカニズムと多形制御,” アイピーシー, 東京, 2010, pp. 6-14.
- 滝山博志, “晶析の強化書 有機合成者でもわかる晶析操作と結晶品質の最適化,” サイエンス&テクノロジー, 東京, 2010, pp. 12-18.
- Kubota N., *J. Crystal Growth*, 310, 629-634 (2008).
- Marciniak B., *J. Crystal Growth*, 236, 347-356 (2002).
- Sangwal K., *J. Crystal Growth*, 311, 4050-4061 (2009).
- Bonnin-Paris J. et al., *Chem. Eng. Comm.*, 198, 1004-1017 (2011).
- Yalkowsky S. H. et al., “Handbook of Aqueous Solubility Data,” CRC PRESS, Boca Raton, 2003, p 394.
- Mitchell N. A. et al., *J. Crystal Growth*, 312, 2740-2746 (2010).
- Nyvlt J., *J. Crystal Growth*, 3/4, 377-383 (1968).
- Sangwal K., *J. Crystal Growth*, 312, 103-109 (2011).
- Kashchie D. et al., *J. Crystal Growth*, 312, 698-704 (2011).
- Boyd S. et al., *J. pharm. Sci.*, 99, 3779-3786 (2010).