

Fig. 3 ヘキサメタリン酸ナトリウム水溶液中での沈降炭酸カルシウムの粒子径分布の経時変化

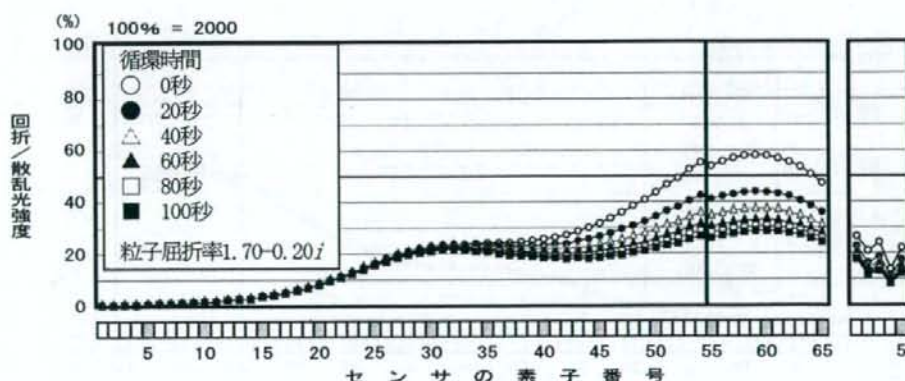


Fig. 4 ヘキサメタリン酸ナトリウム水溶液中での沈降炭酸カルシウムの光強度分布の経時変化

は、センサ素子番号の小さい領域で強度上昇は見られないので、粒子径分布の変化は、微粒子の凝集ではなく溶解によるものであることがわかる。これらの結果から、難溶性医薬品であっても沈降炭酸カルシウムと同程度の溶解度を示す場合には、有機、無機医薬品のいかに問わず、測定中に粒子径分布が変化することを強く示唆している。したがって、このような医薬品の粒子径測定にあたっては、試料の前処理条件や装置内での循環時間の設定には十分に注意する必要がある。

### 3.2 分散媒に蒸留水を用いた場合

Fig. 5 に沈降炭酸カルシウムの粒子径分布曲線の経時変化を示す。この手順変更の目的は、分散剤として用いたヘキサメタリン酸ナトリウムの添加濃度を低下させることにあり、この操作によって測定

時の分散剤濃度は最初の場合の約 1/60 に低下することになる。分散媒をヘキサメタリン酸ナトリウム水溶液から蒸留水に変更することにより、試料母液を装置に注入した直後には粒子の溶解はほとんど起こらないため、散乱光強度の低下もほとんど起こらない。そのため、試料母液の注入量をそのままにしておくと散乱光強度が高くなりすぎてしまうので、注入量を 5 mL から 4 mL に変更した。Fig. 6 に Fig. 4 の場合と同様に、粒子の光強度分布曲線の経時変化を示す。Fig. 5 及び 6 のいずれの結果においても、0.2 wt% ヘキサメタリン酸ナトリウム水溶液を用いた場合のような有意な経時変化は認められなかった。これは試料母液を装置の投入部に注入した時点で測定時の分散剤濃度が低下したことによって分散媒に対する沈降炭酸カルシウムの溶解度が低

このように上記D社及びE社の結果を除くと、いずれの試料についても積算ふるい下30%以上では機種間のばらつきは少なかったといえるが、その反面では分布曲線の形状は機種間で微妙な相違が認められた。これは回折・散乱光から粒子径分布を計算する際のソフトウェアの違い、使用したレーザー光線の波長、回折・散乱光センサーの数、感度、配置及び形状などのハードウェアの違いに起因しているものと考えられる。機種間やメーカー間でこれらを統一することは難しいので、得られた粒子径分布曲線の形状の差異、すなわち粒子径分布の相違は避けがたく、ある程度のばらつきは許容しなければならないと思われる。

## 2. 粒子屈折率の取扱い

粒子屈折率の取扱いについては、メーカー間で大きな違いが認められた。今回の共通試料については、前述のようにあらかじめ各メーカーに参考値として文献<sup>19)</sup>に記載されている数値(2.1 試料の項参照)を提示した。結果的にはこの値をそのまま使用したメーカーと、独自に適正屈折率を設定したメーカーがあった(Table 1)。なお、この参考値はあくまでも純粋に屈折率を測定したものであり、粒子形状や使用したレーザー光の波長は考慮されていない。したがって、本来この屈折率を使用することには問題があるはずであるが、試験結果では8社間に大きな相違はなかった。この理由の一つとして、今回の試料は粒子屈折率の影響を比較的受けにくい領域(>10 μm)の粒子を多く含んでいたことが挙げられる。更に参考値をそのまま使用した機種データの屈折率にあまり敏感に反応しなかったことも考えられる。逆にいえば、独自の屈折率を使用した機種は、データに屈折率の影響が出やすいことも考えられる。このことは、前者は安定したデータが得られるものの、粒子径分布の微妙な差異は検出できない恐れがあることを示唆している。一方、後者は屈折率の影響を受けやすいので、測定条件の設定等においてある程度の知識や熟練が必要であることを示している。

以上の結果から、今回の共通試料を用いた測定結果では、一部において試料の前処理法の違いによる差異が出ている可能性もあるが、熟練者が測定すると機種間のばらつきは予想以上に小さかった。した

がって、今回得られた機種間のデータの差異は、これら装置の通常の使用状態で認められる許容範囲内であるといえる。

ところで、緒言の項で既に述べたように、本測定法は日局では一般試験法としてではなく[参考情報]として記載されている。芦澤ら<sup>13)</sup>は本法による測定者間のデータのばらつきを縮小するためには、試料の分散法をできるだけ統一することが望ましいと指摘しているが、試料量、分散装置(超音波槽など)の種類や分散時間により分散状態は異なり、分散条件の規格・統一化は困難である。このように、レーザー回折・散乱法は測定結果に影響を及ぼす因子が極めて多く、試験条件を厳密に設定しにくいことが、本測定法を日局一般試験法として取り込みにくいものにしていてと考えている。

## 3. 分散媒の違いによる沈降炭酸カルシウムの粒子径分布の経時変化

### 3.1 分散媒にヘキサメタリン酸ナトリウム水溶液を用いた場合]

Fig. 3に沈降炭酸カルシウムの粒子径分布曲線の経時変化を示す。なお、粒子屈折率は1.70-0.20*i*に設定した。Fig. 3よりメジアン径は測定回数が増加する(すなわち、分散液の循環時間が延長する)につれて粗粒子側へシフトした。また粒子径分布を全体的に見ると微粒子領域の分布量が減少したことが顕著に示されている。このような現象は、循環中に試料粒子が分散媒に徐々に溶解し、微粒子の粒子量が減少したことを示唆している。また、試料中に存在する粒子は、通常は微粒子から先に溶解していくので、結果的に粒子径分布は時間の経過と共に粗粒子側へシフトしていったものと思われる。このような傾向を確認するために、循環による試料粒子の経時変化を、光強度分布の変化として見てみると、循環時間の経過に伴って散乱光強度と吸光度の顕著な低下が起こっていることが分かる(Fig. 4)。これは粒子量の減少、すなわち、溶解による試料粒子の一部消失を端的に示している。もし、微粒子の溶解ではなく凝集が起こっているとすると、光強度分布のうち、光軸の中心に近い順に付したセンサ番号の大きい領域では強度低下(微粒子の減少)が起こり、センサ番号の小さい領域で強度上昇(粗粒子の増加又は生成)が起こる。このケースで



Table 2 沈降炭酸カルシウムの積算ふるい下10%, 50%, 90%径

会社 記号	タルク			沈降炭酸カルシウム		
	10%径 [ $\mu\text{m}$ ]	50%径 [ $\mu\text{m}$ ]	90%径 [ $\mu\text{m}$ ]	10%径 [ $\mu\text{m}$ ]	50%径 [ $\mu\text{m}$ ]	90%径 [ $\mu\text{m}$ ]
A	5.3	20.7	52.8	4.4	17.9	37.2
B	5.0	19.9	48.7	2.7	17.2	34.4
C	6.1	21.1	50.2	6.5	17.8	37.0
D	5.1	19.1	48.7	7.4	18.0	34.4
E	8.3	22.1	60.7	9.7	19.6	34.7
F	5.8	23.8	61.7	6.2	20.7	40.1
G	7.3	25.0	53.5	5.2	20.5	37.8
H	4.8	22.0	52.9	1.5	17.5	40.2
平均値± 標準偏差	6.0±1.2	21.7±2.0	53.7±5.0	5.5±2.6	18.7±1.4	37.0±2.4
変動係数(%)	20.0	9.2	9.3	47.3	7.5	6.5

ラメータと試料物性が合っていなかったことも考えられる。またE社のデータについては、粒子屈折率の取扱いの問題とデータ処理にも原因があったのではないと思われる。

### 1.2 沈降炭酸カルシウム

Fig. 2 に沈降炭酸カルシウムに関して得られた粒度分布曲線を示す。積算ふるい下30%以上の領域では、D社（下から2番目の曲線）の結果を除けば機種間のばらつきは少なく（変動係数は約7%）、

許容範囲内であると考えられた。このことから、タルクの場合と同様にシステム全体は良好に作動しているとみなしてよい。しかし、積算ふるい下30%以下では、ばらつきはタルクの場合より大きくなり、変動係数もタルクの場合の2倍を超えるものであった。本試料の場合、タルクに比べて微粒子が多かったことが測定時に観察されており、各社の前処理条件の微妙な差異や屈折率取扱いの際の差異がより顕著に現れたものと思われる。

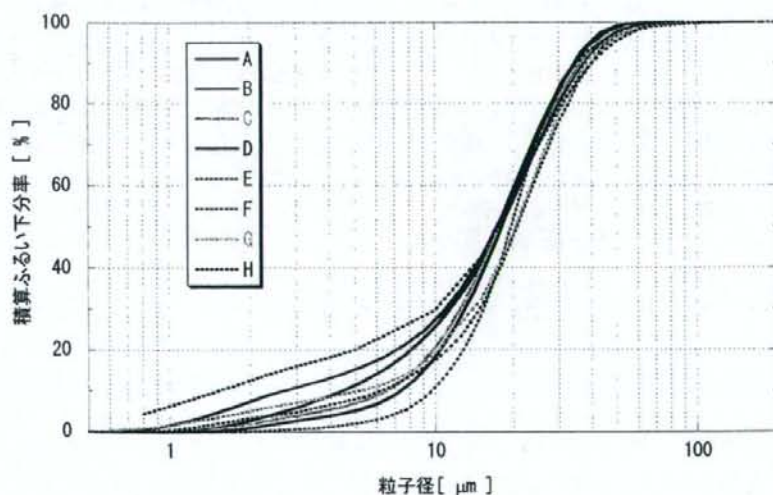


Fig. 2 沈降炭酸カルシウムの積算ふるい下分布曲線 (A~H: 会社記号)

Table 1 各社の測定条件

会社 記号	タルク			沈降炭酸カルシウム		
	分散媒 (特記事項)	分散方法	粒子屈折率	分散媒 (特記事項)	分散方法	粒子屈折率
A		超音波バス 150W/3分	1.67 - 0 <i>i</i>		超音波バス 150W/3分	1.67 - 0 <i>i</i>
B		超音波バス90W/3分, 内蔵超音波40W/1分	1.56 - 0 <i>i</i>		超音波バス90W/3分, 内蔵超音波40W/1分	1.59 - 0 <i>i</i>
C		超音波バス170W/3分	1.59 - 0 <i>i</i>		超音波バス170W/3分	1.59 - 0 <i>i</i>
D	注1	超音波バス 100W/3分	1.59 - 0 <i>i</i>		超音波バス 100W/3分	1.59 - 0 <i>i</i>
E		超音波バス80W/3分	1.54 - 0.1 <i>i</i>	注4	内蔵超音波バス80W/1分	1.59 - 0.1 <i>i</i>
F	注2	超音波バス100W/3分, スプーンによる手攪拌	1.70 - 0.05 <i>i</i>		超音波バス100W/3分, スプーンによる手攪拌	1.70 - 0.01 <i>i</i>
G	注3	内蔵超音波40W/3分	1.54 - 0 <i>i</i>		内蔵超音波40W/3分	1.59 - 0 <i>i</i>
H		超音波バス 100W/3分	1.60 - 0 <i>i</i>		超音波バス 100W/3分	1.60 - 0 <i>i</i>

\* 分散媒は、蒸留水にヘキサメタリン酸ナトリウムを 0.2wt%の濃度で溶解させた水溶液とした。

注1) 分散媒+家庭用中性洗剤3滴/50mL

注2) 分散媒+家庭用中性洗剤

注3) 分散媒+極微量の界面活性剤

注4) 分散媒+界面活性剤1滴

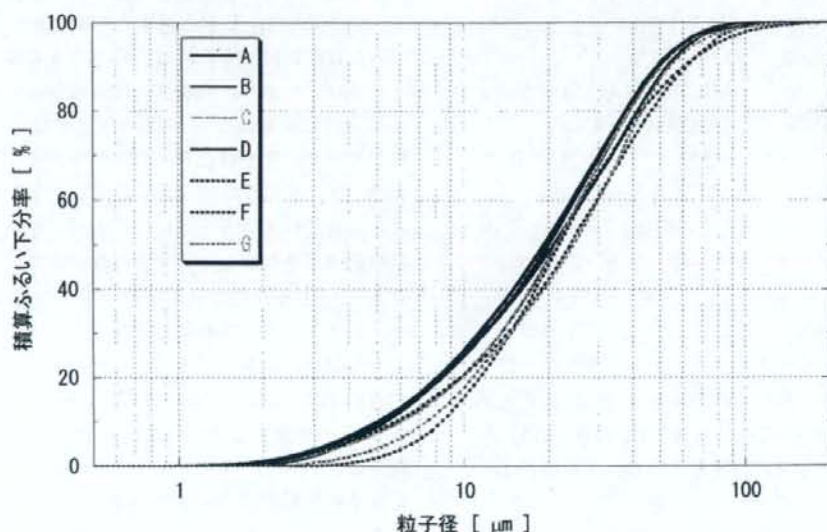


Fig. 1 タルクの積算ふるい下分布曲線 (A~G: 会社記号)



注意した。なお、測定操作はそれぞれの装置で定められた方法による。

また、沈降炭酸カルシウムについて、試料の前処理法と粒子屈折率の影響を検討した際には、試料母液は前記共通試料の場合に準じて調製したが、操作手順は以下の方法による。

- ① 50 mL ビーカー内に試料約 1 g をとり、分散媒約 50 mL を加える。
- ② このビーカーを超音波槽に入れ、3 分間超音波照射する。
- ③ 装置本体に蒸留水を 250 mL 注入し、測定部本体のフローセルとの間で循環させ、ブランク測定を行う。
- ④ 超音波処理済みの試料母液をマグネチック・スターラーで攪拌しながらピペットで 5 mL 採取し、装置の試料投入部に注入する。
- ⑤ 循環系内の試料濃度が均一になった時点で測定を開始し、以後、30 秒ごとに 6 回測定を行い、データを保存する。

### 3. 測定装置

今回使用した 8 種類の測定装置のメーカー名と機種名は、以下のとおりである (50 音順)。

- ・シスメックス(株) マスターサイザー 2000
- ・(株)島津製作所 SALD-2100
- ・(株)セイシン企業 LMS-3000
- ・日機装(株) MICROTRAC MT3300
- ・(株)日本レーザー HELOS&RODOS  
(分散ユニット:QUIXEL)
- ・(株)ニューメタル エンド ケミカル  
コーポレーション CILAS1064 Liquid
- ・ベックマン・コールター(株)  
LS1 3320
- ・(株)堀場製作所 LA-920

なお、沈降炭酸カルシウムを用いて試料の前処理法と粒子屈折率の影響を検討する場合には、測定機種はレーザー回折式粒度分布測定装置 (SALD-2200, (株)島津製作所) のみを用いた。本装置の基本的な仕様は、以下のとおりである。

- ・測定原理:レーザー回折・散乱法
- ・測定範囲:0.03~1000  $\mu\text{m}$
- ・使用光源:半導体レーザー (680 nm)

### 4. 測定

前述の試料を装置メーカー 8 社に送付し、同一の前処理法による測定を依頼した。本法に基づく装置メーカーは上記の 8 社以外にも 2, 3 社があるが、国内で使用されている装置の 90% 以上はこれら 8 社で占められている。Table 1 に各社の測定条件を示す。なお、表中において複素数の形で表された粒子屈折率の中で、実数部は通常の意味 (スネルの法則で定義される幾何学的な意味) での屈折率であり、虚数部は物質内部での光の減衰の程度を表す項である。また、次項での測定結果の比較においては、公正を期するためにメーカー名は付きずに A 社~H 社とした。なお、今回の測定は湿式分散法によって行ったが、この方法はレーザー回折・散乱法による粒子径測定法としては最も一般的な方法である。

### 結果と考察

#### 1. 粒子径分布曲線の形状

##### 1.1 タルク

Fig. 1 にタルクに関して得られた粒度分布曲線 (以後、粒子径分布に関係する図は全て粒子径範囲を 1~100  $\mu\text{m}$  としている) を示す。また、この曲線から得られた積算ふるい下 10%, 50% 及び 90% 径とこれらの平均値及び標準偏差, 変動係数の値を Table 2 に示す。D 社 (最上の曲線) 及び E 社 (最下の曲線) の結果を除けば、残りの 6 曲線は互いによく近接しており、機種間のばらつきは少ないといえる。特に積算ふるい下 30% 以上ではこの傾向は顕著であり、変動係数は 9% 程度であった。このことは 100  $\mu\text{m}$  付近の粒子も滞留することなく検出部に送られていることを示唆しており、検出系及び懸濁液循環系を含めたシステム全体が良好に作動しているといえる。ただし、今回の粒子密度は 3.0 g/cm<sup>3</sup> 以下であり、比較的輸送しやすい条件であったことも結果に影響したものと思われる。一方、積算ふるい下 30% 以下の微粒子側で、特に粒子屈折率の影響を考慮しなければならない 10  $\mu\text{m}$  以下の領域ではばらつきがやや大きくなったが、これは機種による粒子屈折率の取扱いの違いによるものと思われる。なお、D 社についてはいずれの試料も他機種より小粒子側に偏った粒子径分布を示した。この原因としては、試料の分散法や循環法によるのではなく、測定条件の設定の誤り、あるいは装置の設計バ

粒子形状<sup>6,11)</sup>、粒子屈折率<sup>7,11)</sup>などの粉体物性や測定時の粒子濃度<sup>8,9,12)</sup>が測定結果に及ぼす影響、適正屈折率パラメータ決定用評価関数の検討<sup>12)</sup>、更には他の測定法との比較<sup>10)</sup>等が検討されている。しかし、本法は測定原理面では確かにほぼ確立されているものの、装置構成や内部演算アルゴリズムが異なると、同一試料であっても測定結果が異なることがある。また、ハードウェアについては各メーカー独自の設計に基づいたブラックボックスの状態にあるため、装置を正しく使用し、測定結果を正確に判断するにあたっては、必要な注意事項を確認しておかねばならないことも指摘されている。

このような状況の中で、医薬品分野では同一の粉体試料を対象として異なった機種を用いて得られた結果の比較については、著者らの知る限り過去に1例<sup>13)</sup>があるのみであり、未だ十分な検討がなされているとはいえない。また、この調査時点から既に10年以上が経過した現在では、各社の製品にはかなりの改善と性能向上がみられている。このような現状に鑑みて、著者らは最近の装置による測定結果に関する問題点を改めて明らかにしておく必要があると考え、湿式分散法により2種類の共通試料の粒子径分布を測定し、機種間の結果を比較・検討した。なお、前記の文献<sup>13)</sup>では、測定は装置のユーザーである製薬メーカーの担当者によるものであったが、今回は一層の厳密さを求めるために、装置の特性を十分に把握している各々の装置メーカーの技術者による測定結果を期待した。

一方、レーザー回折・散乱法は粉体の種々の物性の影響を受けにくい測定法ではあるが、粒子によるレーザー光の散乱現象には特に粒子屈折率が深く関係しているため、適正でない屈折率の数値を用いて測定(計算)すると、粒子径の測定結果に重大な誤りを招くことになる。したがって、その誤差の度合いを明確にしておく必要があると思われる。そこで本報では前半部における機種間の測定結果の比較に加えて、後半部では試料の前処理条件が結果に及ぼす影響、更に適正な屈折率を選択するための指針を得るために、粒子屈折率の影響についても検討した。

## 実験方法

### 1. 試料

試料として、以下の2種類の試料を測定用試料と

して用いた。

a. 日本薬局方タルク(日興製薬㈱, Lot No. 532, 260)

b. 日本薬局方沈降炭酸カルシウム(㈱小西利七商店, Lot No. 120, 205)

なお、日局15によれば、いずれの試料も微細な結晶性の粉末で、かつ水にほとんど溶けないが、後者は二酸化炭素が存在すると溶解性が増すとされている。また、粒子屈折率及び粒子密度は、文献<sup>14)</sup>に基づけば、それぞれ1.54~1.59(ナトリウムD線)及び2.7~2.8 g/cm<sup>3</sup>(いずれもタルク)、1.59及び2.7 g/cm<sup>3</sup>(いずれも沈降炭酸カルシウム)である。

### 2. 試料の前処理法

前項の共通試料を測定する際には、(財)日本粉体工業技術協会計装測定分科会 検定用粒子検討小委員会との共同研究により、測定時における以下の標準的な試料前処理法を設定した。

#### 1) 分散媒

分散剤としてヘキサメタリン酸ナトリウムを用い、これを蒸留水に0.2 wt%濃度となるように溶解させた水溶液を分散媒として使用した。

#### 2) 試料母液の調製法

沈降炭酸カルシウムについては、50~100 mL ビーカーに約1.5 gの試料を入れ、上記の分散媒を約50 mL加えた後、100 Wの超音波バス中でスパチュラ又はガラス棒で常に攪拌しながら、3分間超音波を照射したものを試料母液とした。

タルクについては、50~100 mL ビーカーに約1 gの試料を入れ、これに家庭用中性洗剤3滴と極少量(試料全体がぬれる程度)の分散媒を加えて全体をよくなじませ、更に分散媒を約50 mL加えた後、100 Wの超音波バス中でスパチュラ又はガラス棒で常に攪拌しながら、3分間超音波を照射したものを試料母液とした。

#### 3) 装置への試料母液の投入

あらかじめ装置の暖気運転を行っておき、測定系内に分散媒を循環させた状態でブランク測定を行った。ブランク測定の後、装置の試料分散槽にその装置の適正濃度になるまで試料母液を注入した。注入操作に当たっては、試料母液を常に攪拌しながら操作し、試料母液中で粒子の偏析が起こらないように



レーザー回折・散乱法を用いた粒子径測定に関する基礎的検討  
— 湿式分散法における測定条件及び粒子特性が粒子径分布に及ぼす影響 —

松田 芳久<sup>\*1</sup>, 木下 健<sup>\*2</sup>, 森 康維<sup>\*3</sup>,  
芦澤 一英<sup>\*4</sup>, 柘植 英哉<sup>\*5</sup>, 寺岡 麗子<sup>\*1</sup>

(受付:平成19年11月15日, 受理:平成20年6月23日)

緒 言

医薬品原薬や製剤用添加剤の大多数は固体状であるが、これらの粉体物性（粒子径、粒子径分布、比表面積、粒子密度、流動性、充てん性、圧縮性など）が最終剤形の製剤特性に密接に関係し、製剤のバイオアベイラビリティにも影響を及ぼす場合があることはよく知られている。これらの事実を踏まえて、薬局方においても合理的かつ科学的妥当性に基づいた粉体物性評価法の確立を目指した国際調和の必要性が認識され、JP、USP及びEPの三極間で活発な調和作業が進められている。このような状況の中で、日局でも調和原案について審議が重ねられてきた結果、緊要な測定法として、粒子径測定法のうち光学顕微鏡法及びふるい分け法<sup>1,2)</sup>、比表面積測定法<sup>3,4)</sup>、かさ密度及びタップ密度測定法<sup>5)</sup>、粒子密度測定法、粉体の流動性について調和が順次完了し、薬局方に取り込まれるか、又は予定されている。

ところで、粉体物性は個々の粒子に関係する1次物性と、これらの粒子集合体が示す2次物性に分けられるが、前者に関係する物性の中で最も基本的で重要なものは、粒子径と粒子径分布である。なぜならば、これらの物性のいかに2次物性である流動性や充てん性に直接に関係し、最終的には固形製剤の質量偏差や製剤中の有効成分の含量均一性にも影響を及ぼすことがあるからである。粉体工学の分野

ではこれまで多数の粒子径測定法が利用されており、これらの中で光学顕微鏡法は粒子の形状や表面状態を直接に観察できるので、工業分野を問わず広範囲に利用されている。しかし、この方法は個々の粒子の観察には適しているが、本法によって粒子径分布を測定する場合には凝集粒子の取扱いや測定粒子数とデータの信頼性の関係等、多くの難点を有していることは否めない。最近では画像処理装置を利用した測定法が用いられているが、一般的な粒子径分布測定法としては限界があると考えられる。一方、ふるい分け法は比較的大きい粒子又は剤粒の粒子径分布を簡便に測定する方法として製薬企業においても汎用されているが、本法についても凝集性粒子の取扱いや測定法としての正確さにおいていくつかの問題点がある。

これらの測定法に対して、最近ではレーザー回折・散乱法を利用した粒子径測定法が汎用されており、局方の国際調和の場においてもEPから「レーザー回折法による粒子径測定法」が提案され、2007年10月に調和が完了した。本法は単色性と干渉性に優れたレーザー光源を利用した粒子の光散乱現象に基づく測定法であるが、高性能なパーソナルコンピュータや最適に設計された高感度センサーの利用と相まって、操作が容易で、極めて迅速かつ再現性の高い粒子径測定が行える種々の装置が各メーカーから市販されている。本法に関しては、これまでに

\*1 神戸薬科大学製剤学研究室 神戸市東灘区本山北町4-19-1 (〒658-8558)

\*2 株式会社津製作所分析計測事業部応用技術部 京都市中京区西ノ京桑原町1 (〒604-8511)

\*3 同志社大学工学部物質化学工学科 京田辺市多々羅都谷1-3 (〒610-0394)

\*4 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部 世田谷区上用賀1-18-1 (〒158-0098)

\*5 第一三共(株)信頼性保証本部 中央区日本橋本町3-5-1 (〒108-8426)

## Acknowledgements

We wish to thank Motoo Shiro and Akira Kishi, Rigaku corporation for the single crystal X-ray analysis and simultaneous XRD–DSC measurement.

## References

- Airaksinen, S., Luukkonen, P., Jorgensen, A., Karjalainen, M., Rantanen, J., Yliruusi, J., 2003. Effects of excipients on hydrate formation in wet masses containing theophylline. *J. Pharm. Sci.* 92, 516–528.
- Alejska, M., Wiewiorowska, M.D.B., 1994. The crystal engineering of cytidine (Cyd), 2'-deoxycytidine (dCyd) and their phosphate salts Part 3. The main stages of the transcristallization processes of the solid-state mixture in which dCyd mono(dihydrogenphosphate) salt is transformed into dCyd hemi(dihydrogenphosphate) salt and vice versa. *J. Mol. Struct.* 325, 137–148.
- Bhatia, A., Kumar, R., Kastare, O.P., 2004. Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation. *J. Pharm. Sci.* 7, 252–259.
- Brigger, I., Chaminade, P., Marsaud, V., Appel, M., Besnard, M., Gurny, R., Renoit, M., Couvreur, P., 2001. Tamoxifen encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. A new antiestrogen formulation. *Int. J. Pharm.* 214, 37–42.
- Ghan, G.A., Lalla, J.K., 1992. Effect of compressional forces on piroxicam polymorphs. *J. Pharm. Pharmacol.* 44, 678–681.
- Goldberg, I., Becker, Y., 1987. Polymorphs of tamoxifen citrate: detailed structural characterization of the stable form. *J. Pharm. Sci.* 76, 259–264.
- Ho, S., Calder, R.J., Thomas, C.P., Heard, C.M., 2004. In-vitro transcutaneous delivery of tamoxifen and gamma-linolenic acid from borage oil containing ethanol and 1,8-cineole. *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 1357–1364.
- Hoelgaard, A., Moeller, N., 1983. Hydrate formation of metronidazole benzoate in aqueous suspensions. *Int. J. Pharm.* 15, 213–221.
- Jorgensen, A., Rantanen, J., Karjalainen, M., Khriachtchev, L., Rasanen, E., Yliruusi, J., 2002. Hydrate formation during wet granulation studied by spectroscopic methods and multivariate analysis. *Pharm. Res.* 19, 1285–1291.
- Khankari, R., Chen, L., Grant, D.J., 1998. Physical characterization of nedocromil sodium hydrates. *J. Pharm. Sci.* 87, 1052–1061.
- Kojima, T., Onoue, S., Murase, N., Katoh, F., Mano, T., Matsuda, Y., 2006. Crystalline form information from multi-well plate salt screening by use of Raman microscopy. *Pharm. Res.* 23, 806–812.
- Kojima, T., Kato, F., Teraoka, R., Matsuda, Y., Kitagawa, S., Tsubako, M., 2007a. Physicochemical characterization of tamoxifen citrate pseudopolymorphs, ethanolate and methanolate. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 407–411.
- Kojima, T., Onoue, S., Katoh, F., Teraoka, R., Matsuda, Y., Kitagawa, S., Tsubako, M., 2007b. Effect of spectroscopic properties on photostability of tamoxifen citrate polymorphs. *Int. J. Pharm.* 336, 346–351.
- Morris, K.R., Griesser, U.J., Eckhardt, C.J., Stowell, J.G., 2001. Theoretical approaches to physical transformations of active pharmaceutical ingredients during manufacturing processes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48, 91–114.
- Otsuka, M., Teraoka, R., Matsuda, Y., 1991. Physicochemical stability of nitrofurantoin anhydrate and monohydrate under various temperature and humidity conditions. *Pharm. Res.* 8, 1066–1068.
- Otsuka, M., Matsumoto, T., Higuchi, S., Otsuka, K., Kaneniwa, N., 1995. Effect of compression temperature on the consolidation mechanism of chlorpropamide polymorphs. *J. Pharm. Sci.* 84, 614–618.
- Poole, J.W., Owen, G., Silverio, J., Freyhof, J.N., Rosenman, S.B., 1968. Physicochemical factors influencing the absorption of the anhydrous and trihydrate forms of ampicillin. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* 10, 292–303.
- Shenoy, D.B., Amiji, M.M., 2005. Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int. J. Pharm.* 293, 261–270.
- Trask, A.V., Motherwell, W.D., Jones, W., 2005. Pharmaceutical cocrystallization: engineering a remedy for caffeine hydration. *Cryst. Growth Des.* 5, 1013–1021.
- van Tonder, E.C., Maleka, T.S., Liebenberg, W., Song, M., Wurster, D.E., de Villiers, M.M., 2004. Preparation and physicochemical properties of niclosamide anhydrate and two monohydrates. *Int. J. Pharm.* 269, 417–432.
- Zeisig, R., Ruckerl, D., Fichtner, I., 2004. Reduction of tamoxifen resistance in human breast carcinomas by tamoxifen-containing liposomes in vivo. *Anticancer Drugs* 15, 707–714.
- Zhu, H., Yuen, C., Grant, D.J.W., 1996. Influence of water activity in organic solvent + water mixtures on the nature of the crystallizing drug phase. I Theophylline. *Int. J. Pharm.* 135, 151–160.



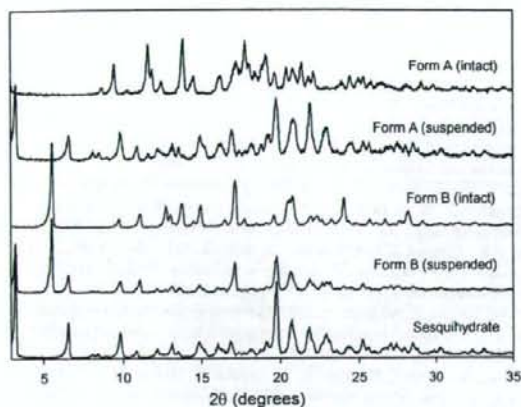


Fig. 7. PXRD patterns of tamoxifen citrate forms A and B, their suspended samples and sesquihydrate.

no transformation was observed. These results suggested that the transformation to the sesquihydrate would be a water-mediated one.

To the best of our knowledge, few studies on changes of stoichiometry from the viewpoint of the pharmaceutical manufacturing process have been reported (Alejska and Wiewiorowska, 1994; Trask et al., 2005). The solvent-drop grinding of an ingoing 2:1 caffeine/maleic acid ratio with methanol addition produces cocrystal product with a stoichiometry of 1:1 with excess caffeine. Whereas, the solvent-drop grinding of an ingoing 1:1 material with toluene provides cocrystal product with a stoichiometry of 2:1 with excess maleic acid and some unreacted residual caffeine as a minor component (Trask et al., 2005). We have described one of the few cases where tamoxifen citrate was transformed into tamoxifen hemicitrate sesquihydrate with a change of stoichiometry of salt in water.

Recently, the transformation of polymorphs and hydrate during the manufacturing of drug products has attracted attention (Airaksinen et al., 2003; Morris et al., 2001; Otsuka et al., 1995). Notably, careful attention should be paid to the wet granulation and subsequent drying processes, since wet granulation could induce transformation from the metastable form to the hydrate or the stable form and conversely drying could induce transformation from the hydrate to anhydrous form. To assure stability during these manufacturing pro-

cesses, kneading of the mixed powder of tamoxifen citrate form A and microcrystalline cellulose (1:19), the adding of different amounts of purified water, storage, and then drying were performed (Table 2). The PXRD patterns of the sample kneaded for 5 min suggested no transformation to the hydrate and that form A was quite stable during kneading (wet granulation). During the storage and drying process, the crystalline form change was also not observed. These results indicated that the amount of water used for kneading could not induce the water-mediated transformation to the hydrate.

Water is an acceptable solvent for the pharmaceutical manufacturing of drug substances. In the pharmaceutical manufacturing process, pure water or a binary mixture of some organic solvent and water could be available for salt formation and crystallization as the final step in the synthesis of a drug substance. Notably, water has been often used for wet granulation. From the results described above, tamoxifen citrate would not be transformed into tamoxifen hemicitrate hydrate during pharmaceutical manufacturing processes such as wet granulation, however it could change to the hydrate during manufacturing processes of drug substance such as salt formation and crystallization. These results suggested that the solvent for salt formation and crystallization should be selected with attention to transformation to tamoxifen hemicitrate sesquihydrate having a different stoichiometry from the active ingredient, tamoxifen citrate.

#### 4. Conclusion

We have provided novel insight into tamoxifen citrate modification, tamoxifen hemicitrate sesquihydrate. The results of the elemental analysis, single crystal X-ray analysis, and TGA revealed that the molar ratio of tamoxifen: citric acid: water was 2:1:3 and indicated that the new modification would be tamoxifen hemicitrate sesquihydrate. Simultaneous XRD–DSC measurements also indicated that two hydrates, sesquihydrate and hemihydrate, and an anhydrous form would exist during heating.

We have also demonstrated the physicochemical stability of tamoxifen citrate forms A and B suspended in water and the physicochemical stability of form A during kneading and drying. Tamoxifen citrate suspended in water was transformed into a hydrate within 24 h, whereas tamoxifen citrate in a mixture with microcrystalline cellulose was quite stable during kneading.

Tamoxifen citrate could be transformed into tamoxifen hemicitrate sesquihydrate with the change of the stoichiometry of salt during manufacturing processes such as salt formation and crystallization. To the best of our knowledge, very few studies on changes of stoichiometry have been reported and discussed from the viewpoint of the manufacturing process. Therefore, a thorough understanding of the physicochemical properties of modifications of drug substances is necessary for rational pharmaceutical development, since unexpected changes in the potency of the active ingredient could be caused by a change of stoichiometry during the manufacturing process.

Table 2  
Effects of kneading and drying processes on the crystalline form of tamoxifen citrate

Amount of water added to dry mixture <sup>a</sup> (g/g)	After kneading	After drying
0	Form A	Form A
0.25	Form A	Form A
0.50	Form A	Form A
1.00	Form A	Form A

<sup>a</sup> Tamoxifen citrate form A: microcrystalline cellulose (1:19).



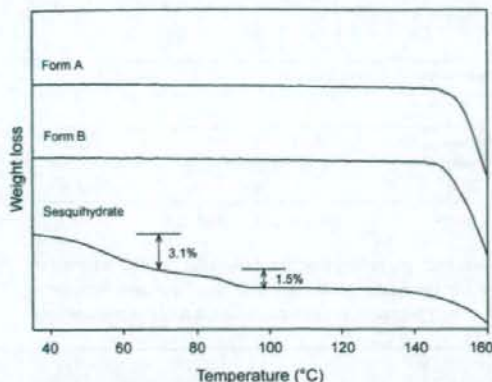


Fig. 5. TGA thermograms of forms A and B, and the hydrate.

### 3.3. Thermal properties

The thermal behavior of tamoxifen hemicitrate sesquihydrate was evaluated by using DSC and TGA. The DSC curve seemed to show a broad endothermic peak at 62.2 °C and two subsequent peaks at 99.6 and 109.2 °C, an exothermic peak at 112.7 °C, and then an endothermic peak due to melting at 120.3 °C, quite different thermal behavior from forms A and B (Fig. 4). The TGA thermogram suggested that two steps of dehydration, indicating the existence of two hydrates, sesquihydrate and hemihydrate, occurred with a weight loss of 3.1 and 1.5%, respectively, corresponding to the endothermic peaks of DSC thermogram (Fig. 5). The TGA thermogram also suggested that the molar ratio of tamoxifen hemicitrate:water was in 2.0:2.6 and the water content was smaller than the theoretical ratio (2.0:3.0). Dehydration would occur under dry nitrogen before the thermogram was recorded during the TG/DTA measurement.

To identify the potential of the two crystalline forms of the hydrate indicated by the results of DSC and TGA, the relationship between PXRD and DSC was made clear by using simultaneous measurements of DSC and PXRD during heating at a rate of 2 °C min<sup>-1</sup> (Fig. 6). The characteristic X-ray diffrac-

tion peak at 19.8° (2 $\theta$ ) of tamoxifen hemicitrate sesquihydrate (Fig. 2) on the PXRD pattern at 32.0–33.8 °C disappeared and a new peak at 20.2° (2 $\theta$ ) appeared at 79.8–82.9 °C with a broad endothermic peak detected by DSC (Fig. 4). The characteristic X-ray diffraction peak at 20.2° (2 $\theta$ ) also disappeared and then a separate new peak at 19.5° (2 $\theta$ ) appeared at 98.7–101.8 °C with an endothermic peak. These results suggested tamoxifen hemicitrate to have two hydrates, sesquihydrate and hemihydrate, and an anhydrous form showing PXRD patterns at 32.0–33.8, 79.8–82.9 and 98.7–101.8 °C in Fig. 6, respectively. Tamoxifen hemicitrate sesquihydrate would change to hemihydrate with the first dehydration, and subsequently to the anhydrous form with the second dehydration. The gradual decrease in the X-ray diffraction intensity of the anhydrous form above 117.6 °C indicated that the crystallinity decreased with the melting of the anhydrous form. During the melting event, slight crystallization with a characteristic peak at 14.2° (2 $\theta$ ) on the PXRD pattern at 117.6–120.6 °C was observed. The results of microscopic observation on the hot-stage also proved that slight crystallization occurred during melting. The DSC thermogram exhibited two endothermic peaks and one exothermic peak at 109.2, 120.3 and 112.7 °C, respectively (Fig. 4). A broad endothermic peak between 105 and 125 °C corresponding to the melting of the anhydrous form and an exothermic peak at 110 °C corresponding with crystallization could result in apparent peaks, thus recording two endothermic peaks at 109.2 and 120.3 °C and an exothermic peak at 112.7 °C on the DSC thermogram.

### 3.4. Effects of crystallization, kneading and drying processes on the crystal form

The physicochemical stability of forms A and B suspended in water at a concentration of 5 mg/mL at 37 °C was evaluated. The PXRD patterns suggested that both forms A and B of tamoxifen citrate were transformed into tamoxifen hemicitrate sesquihydrate within 24 h (Fig. 7). The metastable form A was completely transformed into sesquihydrate, whereas the stable form B was only partially transformed. We have previously demonstrated that both forms were quite stable at least for 2 months even under severe storage conditions at 97% RH at 40 and 60 °C and

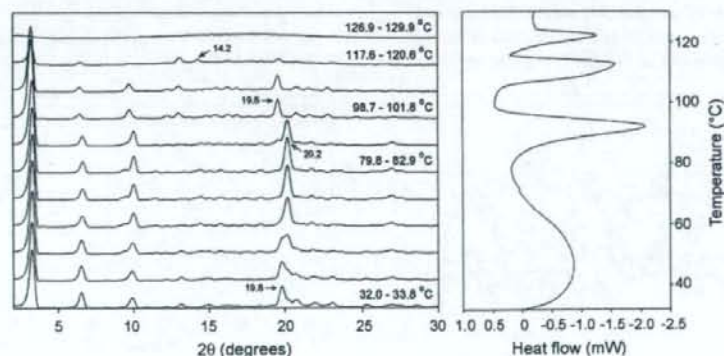


Fig. 6. Relationship between the PXRD patterns and DSC thermogram of the hydrate.



Table 1  
Elemental analyses of forms A and B, and the hydrate

Crystalline form	Formula	Elemental analysis (%): calcd. (found)		
		C	H	N
Form A	$C_{26}H_{29}NO \cdot C_6H_8O_7$	68.19 (67.98)	6.62 (6.54)	2.49 (2.29)
Form B	$C_{26}H_{29}NO \cdot C_6H_8O_7$	68.19 (68.04)	6.62 (6.56)	2.49 (2.30)
Sesquihydrate	$C_{26}H_{29}NO \cdot 0.5C_6H_8O_7 \cdot 1.5H_2O$	70.42 (70.70)	7.34 (7.16)	2.83 (2.66)

### 2.5. Physicochemical stability of suspended modifications in water

The physicochemical stability of aqueous suspensions of forms A or B was evaluated by PXRD. Form A or B was suspended in water at a concentration of 5 mg/mL at 37 °C for 24 h. Suspension samples were filtrated and subjected to PXRD analysis.

### 2.6. Physicochemical stability during kneading and after drying

The wet massing method was performed using a pestle and mortar. Tamoxifen citrate form A (10 mg) and microcrystalline cellulose (190 mg) were blended, a different amount of purified water was added, and the mixture was kneaded for 5 min. Then, massed samples were stored for 1 h and subsequently dried at 40 °C under reduced pressure for 2 h. Crystalline forms after wet granulation and drying were evaluated by PXRD. Transformation was confirmed to have occurred based on the characteristic peaks of form A and the hydrate at 2.9 and 3.3° (2θ), respectively.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Stoichiometry of modifications

Elemental analyses were performed to identify the stoichiometry of forms A and B, and the hydrate crystals. The results indicated that the molar ratio of tamoxifen: citric acid for forms A and B was 1:1, whereas that for the hydrate was 2:1 (Table 1). These results suggested the tamoxifen citrate crystallized from water to be a kind of hydrate of tamoxifen hemicitrate that could not be classified as a pseudopolymorph because of a different stoichiometry from tamoxifen citrate. The results of the elemen-

tal analysis also suggested that the molecular ratio of tamoxifen to water for the hydrate was 2:3 and thus the new modification could be identified as tamoxifen hemicitrate sesquihydrate (Fig. 1).

### 3.2. Powder and single crystal X-ray diffraction analyses

Powder X-ray diffraction (PXRD) patterns of crystal forms are shown in Fig. 2. The characteristic diffraction peaks of forms A and B and significant differences between them were observed and PXRD patterns agreed well with the data reported previously (Goldberg and Becker, 1987; Kojima et al., 2007a). The characteristic X-ray diffraction peaks of tamoxifen hemicitrate sesquihydrate were observed at 3.3, 6.5, 9.8 and 19.8° (2θ). The crystal structure of the sesquihydrate was analyzed by single crystal X-ray diffractometry. The results indicated that the sesquihydrate was triclinic ( $a = 13.7939(3)$ ,  $b = 14.3500(3)$ ,  $c = 53.5812(15)$  Å,  $\alpha = 84.7570(18)$ ,  $\beta = 85.0890(18)$ ,  $\gamma = 79.358(2)^\circ$ ), space group  $P-1$  ( $Z = 8$ , density = 1.269 g/cm<sup>3</sup>,  $R_1 = 0.1292$ ). The results of the single crystal analysis of the sesquihydrate also indicated that the molar ratio of tamoxifen: citric acid: water was 2:1:3 and identified the form as tamoxifen hemicitrate sesquihydrate, which coincided with the results of the elemental analysis (Fig. 3). Water molecules were all positioned among citric acid molecules with hydrogen bonds and would play an important role in the stabilization of the crystals consisted of tamoxifen hemicitrate. These results suggested that the crystals whose stoichiometry of tamoxifen: citric acid was 2:1 were only obtained by crystallization from water.

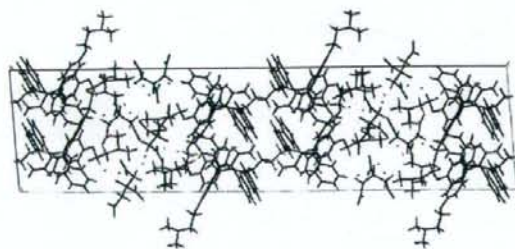


Fig. 3. Crystal structure of the hydrate.

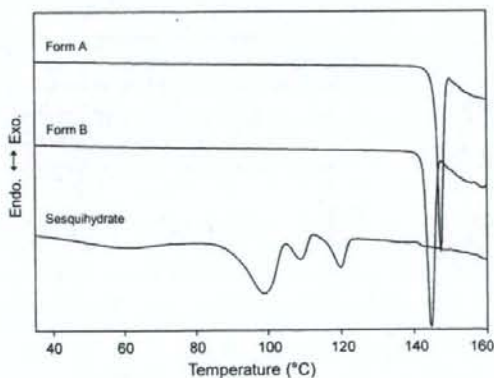


Fig. 4. DSC thermograms of forms A and B, and the hydrate.

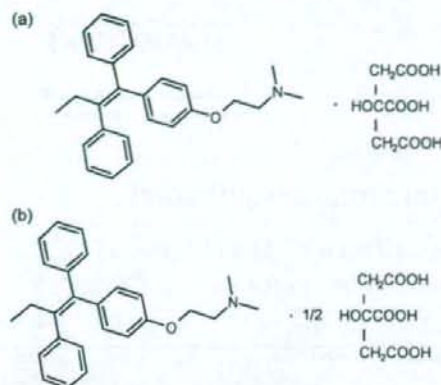


Fig. 1. Chemical structure of tamoxifen citrate (a) and tamoxifen hemicitrate sesquihydrate (b).

used as a model pharmaceutical compound for preformulation studies (Bhatia et al., 2004; Brigger et al., 2001; Ho et al., 2004; Kojima et al., 2006; Shenoy and Amiji, 2005; Zeisig et al., 2004). As for tamoxifen citrate (Fig. 1), two polymorphs, forms A and B, and two pseudopolymorphs, methanolate and ethanolate, have been identified (Goldberg and Becker, 1987; Kojima et al., 2007a,b). In addition, we discovered a novel hydrate of tamoxifen hemicitrate, which was transformed from the anhydrous form of tamoxifen citrate. Even though tamoxifen citrate is widely used all over the world, no investigation of its hydrate has been reported to the best of our knowledge.

In this study, we prepared a novel hydrate of tamoxifen hemicitrate. Its crystal form was identified and characterized by elemental analyses, powder and single crystal X-ray diffractometries, differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), simultaneous XRD–DSC, and hot-stage microscopy, and the conditions for transformation to the hydrate were also examined. In addition, the possibility of transformation to the hydrate from tamoxifen citrate during the manufacturing process was discussed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of modifications

Tamoxifen citrate was obtained from EGIS Pharmaceuticals (Budapest, Hungary). All solvents were purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Form A was a bulk powder purchased from EGIS Pharmaceuticals. Form B was prepared by a method reported previously (Kojima et al., 2007a). The hydrate was obtained by recrystallizing from saturated aqueous solutions of the drug with stirring overnight at room temperature, then filtered and dried in a nitrogen atmosphere.

### 2.2. Elemental analysis

The elemental analysis was performed on an Elementar Vario EL (Elementar Instrument, Germany) with helium (200 mL/min) as the carrier gas.

### 2.3. Powder and single crystal X-ray diffractometries

Powder X-ray diffraction patterns were recorded using a RINT Ultima (Rigaku, Tokyo, Japan) with Cu K $\alpha$  radiation generated at 30 kV and 14 mA at room temperature. Data were collected within the diffraction angle range of 2–40° (2 $\theta$ ) at a step size of 0.02° and a scanning speed of 4° min<sup>-1</sup>.

Single crystal X-ray diffraction data were recorded on a RAXIS-RAPID (Rigaku, Tokyo, Japan) with Cu K $\alpha$  radiation at –183 °C. The crystal structure was solved and refined using SHELX97 software (Sheldrick, 1997).

### 2.4. Thermal analysis

DSC was performed using a DSC 6200 system (Seiko Instruments, Chiba, Japan). The DSC thermogram was obtained in an aluminum open-pan system using a sample weight of ca. 3 mg and a heating rate of 5 °C/min in a nitrogen flow. TGA was performed using a TG/DTA 6200 system (Seiko Instruments). The TGA thermogram was obtained under the same conditions as those for DSC.

Simultaneous XRD–DSC measurements were performed using RINT Ultima III with DSC attachment +HUM (Rigaku, Tokyo, Japan) with Cu K $\alpha$  radiation generated at 40 kV and 50 mA at a heating rate of 2 °C min<sup>-1</sup> in a nitrogen flow. Data were collected within the diffraction angle range of 2–40° (2 $\theta$ ) at a step size of 0.02° and a scanning speed of 28.8° min<sup>-1</sup>.

Thermal changes of crystal morphology were observed on a hot-stage microscope (LK-FDCS, Linkam Scientific Instruments, Surrey, UK) with a heating rate of 10 °C min<sup>-1</sup> in a nitrogen flow.

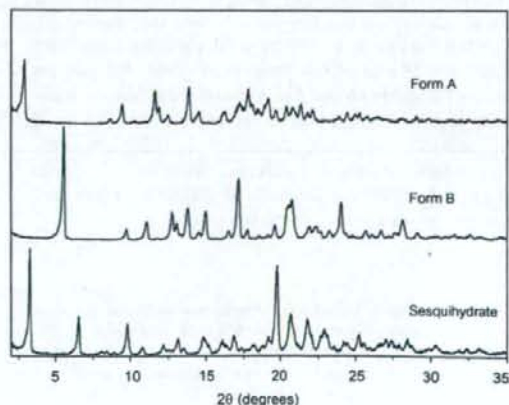


Fig. 2. PXRD patterns of forms A and B, and the hydrate.





## Physicochemical properties of tamoxifen hemicitrate sesquihydrate

Takashi Kojima<sup>a,b,\*</sup>, Fumie Katoh<sup>a</sup>, Yoshihisa Matsuda<sup>a</sup>, Reiko Teraoka<sup>a</sup>, Shuji Kitagawa<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmaceutical Technology, Kobe Pharmaceutical University, Higashinada, Kobe 658-8558, Japan

<sup>b</sup> Science and Technology, Pfizer Global Research and Development, Nagoya Laboratories, Pfizer Japan Inc., 5-2 Taketoyo, Aichi 470-2393, Japan

Received 2 June 2007; received in revised form 5 September 2007; accepted 21 October 2007

Available online 26 October 2007

### Abstract

A novel modification of tamoxifen [(Z)-2-[4-(1,2-diphenyl-1-butenyl) phenoxy]-N,N-dimethylethylamine] citrate, tamoxifen hemicitrate hydrate was prepared. The crystalline form was identified and characterized by powder and single crystal X-ray diffractometries, differential scanning calorimetry (DSC), thermal gravimetric analysis (TGA), and hot-stage microscopy, and its physicochemical stability was also evaluated. The results of an elemental analysis, a single crystal X-ray analysis, and the TGA suggested that the molar ratio of tamoxifen: citric acid: water was 2:1:3 indicating it to be tamoxifen hemicitrate sesquihydrate. Simultaneous XRD–DSC measurements also indicated that two hydrates, sesquihydrate and hemihydrate, and an anhydrous form would exist during heating. The physicochemical stability of tamoxifen citrate forms A and B suspended in water and of form A during kneading and drying suggested that tamoxifen citrate was transformed into tamoxifen hemicitrate hydrate in water within 24 h, whereas tamoxifen citrate in a mixture with microcrystalline cellulose was quite stable during kneading. These results suggested that water and a mixture of water and organic solvent should be used for the manufacturing process with special attention paid to the transformation to tamoxifen hemicitrate sesquihydrate, because it showed a different stoichiometry from the active ingredient, tamoxifen citrate.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Tamoxifen; Hydrate; Physicochemical characterization; Physicochemical stability

### 1. Introduction

The solid-state characterization of crystal forms of drug candidates is important to the process of pharmaceutical development. Notably, research on hydrates is essential since their physicochemical properties provide not only information for understanding the behavior of drugs in the gastrointestinal tract (Hoelgaard and Moeller, 1983; Poole et al., 1968) but also the information for making a suitable decision regarding the manufacturing process, storage conditions, and package design of the drug substance and product (Otsuka et al., 1991; Zhu et al., 1996). Therefore, the screening and characterization of hydrates (Khankari et al., 1998; van Tonder et al., 2004) are often conducted at the early stages of drug development.

Once the hydrate of a drug candidate has been identified, manufacturing risk management such as transformation to the hydrate or anhydrate during the crystallization and formulation processes should be examined. Recently, solid-state transformations during pharmaceutical manufacturing processes such as wet granulation, drying and compression have received attention (Jorgensen et al., 2002; Morris et al., 2001; Otsuka et al., 1995). Theophylline anhydrate was transformed into theophylline monohydrate during wet granulation (Airaksinen et al., 2003). In addition, the possibility of transformation to a theophylline metastable form from the monohydrate during the drying process was indicated (Morris et al., 2001). The transformation of piroxicam from needle-like  $\alpha$ -phase crystals into cubic  $\beta$ -phase crystals during compression was also reported (Ghan and Lalla, 1992).

Tamoxifen, (Z)-2-[4-(1,2-diphenyl-1-butenyl) phenoxy]-N,N-dimethylethylamine, is a selective estrogen receptor modulator, and tamoxifen citrate is widely used as a drug for the treatment of breast cancer. Tamoxifen has also been

\* Corresponding author at: Department of Pharmaceutical Technology, Kobe Pharmaceutical University, Higashinada, Kobe 658-8558, Japan.  
Tel.: +81 78 441 7531; fax: +81 78 441 7532.

E-mail address: [tak\\_kojima@yahoocorp.jp](mailto:tak_kojima@yahoocorp.jp) (T. Kojima).

類や数に応じてカルボキシル基とカルボキシレート基間の強固な single hydrogen-bond アニオンネットワークを持つ多様な結晶を形成することが報告されており<sup>9)</sup>、同様な水素結合ネットワーク形成が非晶質相の多価カルボン酸塩の運動性低下にも寄与する事が示唆された。

ガラス状態の塩は極めて粘度の高い過冷却液体でもあることから、近年研究の進むイオン液体と同様にイオンで構成されるランダム構造をとる。イオン液体ではグリーンケミストリー触媒として求められる低粘度（低いガラス転移温度）の確保を目的に、構成イオンの構造と物性についての体系化が盛んに検討され<sup>7)</sup>、相互作用を弱める事が粘度抑制に有効な事が明らかとなっている。逆に強い相互作用を持つ要素の選択が、強固なガラス固体の合理的な構築につながる事が期待される。

凍結溶液と乾燥固体の転移温度の上昇は、非晶質医薬品の工程と保存の両段階において品質向上につながると考えられる。非晶質成分を構造崩壊（コラプス）を避けて乾燥するには、一次乾燥過程の品温を  $T_g'$  以下に保持する必要があるが、 $-40^\circ\text{C}$  以下での乾燥は一般的な凍結乾燥機の能力を超えたとともに、氷の昇華に長時間を必要とするため経済性の観点から望ましくないとされる。多くの凍結乾燥タンパク質製剤で安定化剤として用いられるトレハロースやショ糖など2糖類の凍結溶液は $-36^\circ\text{C}$  から $-30^\circ\text{C}$  付近に  $T_g'$  を持つことから、同等またはより高い転移温度は実用的な凍結乾燥を可能とする利点を持つ。また室温に比べ十分に高いガラス転移温度を持つ非晶質固体は、凍結乾燥製剤の保存時における分子運動による化学反応や結晶化・収縮を抑制するなど安定性を向上させると考えられた。

カルボン酸塩によるガラス固体は、溶液の多くが pH 4-7 の弱酸性から中性域を示し、適当な添加剤選択により注射剤を含めた各種製剤での活用が期待される。昨年報告した L-アルギニンとクエン酸など経口製剤や注射剤に使用経験のある各種添加剤は、二糖類や水溶性高分子と同様な実用性を持つと考えられるほか、低分子医薬品では主薬の塩形成による直接的なガラス化も可能と考えられ、広い分野での応用が期待される。

## ま と め

多価カルボン酸とアミン類またはアルカリ金属イオンにより形成する塩が、官能基間の水素結合ネットワークを介して、医薬品製剤として実用的な物性を持つガラス固体を形成する事を明らかにした。塩によるガラス固体形成は、多様な構成要素の組合せや濃度比調整が可能であり、目的とする特性に応じた活用が期待される。

## 文 献

- 1) Izutsu, K., Fujimaki, Y., Kuwabara, A. and Aoyagi, N.: Effect of counterions on the physical properties of l-arginine in frozen solutions and freeze-dried solids, *Int. J. Pharm.*, **301**, 161-169 (2005)
- 2) Shalaev, E.Y., Johnson-Elton, T.D., Chang, L. and Pikal, M.J.: Thermophysical properties of pharmaceutically compatible buffers at sub-zero temperatures: implications for freeze-drying, *Pharm. Res.*, **19**, 195-201 (2002)
- 3) Tong, P. and Zografi, G.: Solid-state characteristics of amorphous sodium indomethacin relative to its free acid, *Pharm. Res.*, **16**, 1186-1192 (1999)
- 4) Kadoya, S., Izutsu, K., Yonemochi, E., Terada, K., Yomota, C. and Kawanishi T.: Glass-state amorphous salt solids formed by freeze-drying of amines and hydroxy carboxylic acids: effect of hydrogen-bonding and electrostatic interactions, *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 821-826 (2008)
- 5) Gordon, M. and Taylor, J.S.: Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. I. Non-crystalline copolymers, *J. Appl. Chem.*, **2**, 493-500 (1952)
- 6) Inabe, T.: Mellitate anions: unique anionic component with supramolecular self-organizing properties, *J. Mater. Chem.*, **15**, 1317-1328 (2005)
- 7) Ohno, H.: Functional design of ionic liquids, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **79**, 1665-1680 (2006)



Na のみが凍結乾燥によりケーキ形状のガラス固体となった。BSA の共存下ではコハク酸 2Na を除いて濃縮相が非晶質化し、乾燥によりガラス固体を形成した。

3 個のカルボキシル基を持つトリカルバリル酸の凍結溶液は $-53^{\circ}\text{C}$  に  $T_g'$  を持つ非晶質の濃縮相を形成し、2-3 倍濃度の NaOH または KOH の添加により  $T_g'$  の顕著な上昇が観察された。トリカルバリル酸単独の凍結乾燥では結晶化を伴うコラプスが起きた。融解急冷により作製した非晶質固体は  $0^{\circ}\text{C}$  付近でガラス転移を示し、より高温で結晶化と融解によるピークが観察された。1:2 ナトリウム塩となる領域の凍結乾燥により、 $50^{\circ}\text{C}$  付近に  $T_g$  を持つガラス

固体が得られた (Fig. 5)。

6 個のカルボキシル基を持つメリト酸は凍結水溶液中で結晶化し、加熱過程で $15^{\circ}\text{C}$  付近に共晶融解を示す複数の吸熱ピークが観察された。NaOH 添加は共晶形成を抑制し、多くの濃度比で $-36^{\circ}\text{C}$  付近に転移 ( $T_g'$ ) を示したが、100 mM メリト酸に対して 300 mM NaOH の添加により  $T_g'$  が消失し、400 または 600 mM の添加では  $T_g'$  とともに共晶形成を示す発熱ピークが現われた (Fig. 6)。特定の濃度比における結晶化は、水素結合などが構造形成に必要な規則性を満たすためと考えられた。

## 考 察

一般に糖類など非イオン性物質により構成される非晶質固体のガラス転移温度は、個々の物質が持つ  $T_g$  間で構成比により Gordon-Taylor 式<sup>6)</sup>に従い決まるとされる。凍結溶液の  $T_g'$  についてもほぼ同様な関係が報告されており、本研究で観察されたカルボン酸と他物質の混合による転移温度の顕著な上昇は、塩形成による構成要素間の強い相互作用を示すと考えられた。非晶質固体のガラス転移温度は、残存水分量を低下させる二次乾燥条件の設定などによりさらに上昇する事が期待される。

多価カルボン酸とアミン類の組合せでは、単独の場合に比べて顕著な凍結溶液の  $T_g'$  と乾燥固体の  $T_g$  上昇が観察され、固体の分光測定から複数のカルボキシル基アミノ基間の静電相互作用と水素結合による運動性低下が示唆された。これらの官能基数の重要性は昨年報告した L-アルギニンとクエン酸の凍結乾燥によるガラス固体形成と一致した。各成分中の官能基数の増加は結合密度を増やし、分子 (イオン) がランダムに位置する非晶質固体の粘度を高める (転移温度を上昇) とともに、ガラス転移温度以上の結晶化に必要なイオンの再配列を抑制すると考えられた。今後、非晶質固体の物性を左右する分子 (イオン) 間の相互作用について、他の評価法等も活用しさらに検討を進める事が必要と考えられる。

緩衝液成分やトリカルバリル酸など多価カルボン酸とアルカリ金属イオンを含む凍結溶液と乾燥固体は、いずれもカルボン酸の部分的な脱プロトン化が起こる濃度域で最も高い  $T_g'$  と  $T_g$  を示した。メリト酸など多価カルボン酸は、アルカリ金属イオンの種

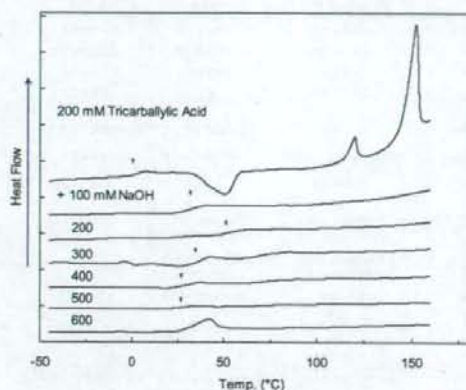


Fig. 5. Effect of sodium hydroxide on the thermal profile of co-lyophilized tricarballylic acid (200 mM). Arrows indicate glass transition temperature of the amorphous solid.

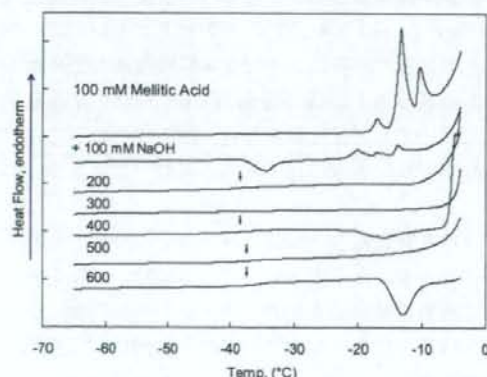


Fig. 6. Effect of sodium hydroxide on the thermal profile of frozen aqueous mellitic acid solutions (200 mM).

を示す緩やかな DSC 曲線, または共晶の形成や融解を示すピークが観察された (Table 1).

各種カルボン酸類とアミン類を含む凍結溶液の熱分析では, 1,3-ジアミノ・2-ヒドロキシプロパンとの混合溶液の例 (Fig.1) に見られるように, 多価カルボン酸との共存による  $T_g'$  (最大濃縮相ガラス転移温度) の顕著な上昇が観察された. 構成分子のカルボキシル, アミノまたは水酸基の増加は転移温度をさらに上昇させた. 一方でカルボン酸の炭素鎖長や光学異性体など構成分子の分子量, 立体構造などによる転移温度への直接的な影響は見られず, 官能基を介した相互作用が非晶質固体の物性を決める主要因となることが示唆された.

1,3-ジアミノ・2-ヒドロキシプロパンとクエン酸を含む溶液を凍結乾燥すると, 設定した一次乾燥温度 ( $-40^{\circ}\text{C}$ ) 以上の  $T_g'$  を持つ試料は最高  $60^{\circ}\text{C}$  程度の転移温度を持つ乾燥前の溶液と同体積の低密度 (ケーキ

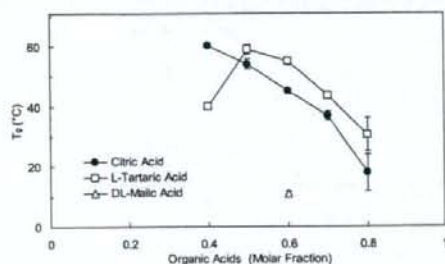


Fig. 2. Glass transition temperatures ( $T_g$ ) of freeze-dried solids containing 1,3-diamino-2-hydroxypropane and organic acids (200 mM total).

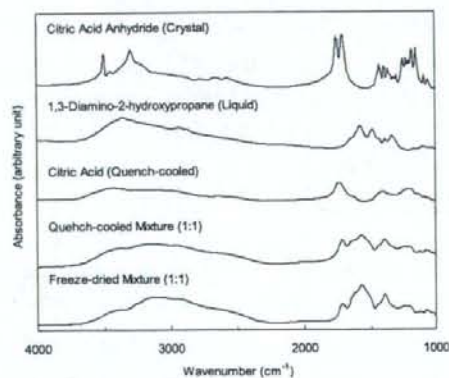


Fig. 3. FT-IR spectra of solids containing 1,3-diamino-2-hydroxypropane, citric acid, and their mixture (1:1 molar ratio).

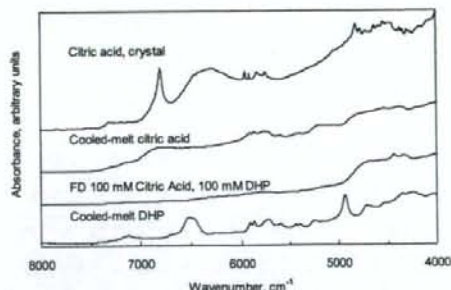


Fig. 4. Diffuse reflection near-infrared spectra of solids containing 1,3-diamino-2-hydroxypropane, citric acid, and their freeze-dried mixture.

Table 2. Physical Properties of Carboxylic Acids and Their Sodium Salts

Excipients	Frozen Solutions (50 mM)		Freeze-dried Solids	
	w/o BSA pH	$T_g$ or peak ( $^{\circ}\text{C}$ )	with 10 mg/ml BSA $T_g$ or peak ( $^{\circ}\text{C}$ )	with 10 mg/ml BSA $T_g$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
$\text{Na}_2$ -Citrate	8.5	$-43.0 \pm 1.2$	$-35.8 \pm 0.1$	$74.9 \pm 2.0$
$\text{Na}_2\text{H}$ -Citrate	5.3	$-39.1 \pm 0.0$	$-31.6 \pm 0.2$	$78.2 \pm 2.6$
$\text{NaH}_2$ -Citrate	3.7	$-33.2 \pm 0.2$	$-24.4 \pm 1.1$	$61.1 \pm 1.8$
Citric Acid	2.3	$-55.0 \pm 0.3$	n.d.	$43.7 \pm 1.8$
$\text{Na}_2$ -L-Tartrate	7.2	$-40.0 \pm 0.1$	$-32.6 \pm 0.1$	$68.8 \pm 2.6$
$\text{NaH}$ -L-Tartrate	3.5	Exotherm: $-26.2$ , $-15.0$	Exotherm: $-10.9$	$56.6 \pm 3.8$
L-Tartaric acid	2.3	$-56.6 \pm 0.8$	n.d.	$43.7 \pm 1.8$
$\text{Na}_2$ -Succinate	8.0	Exotherm: $-36.6$ Endotherm: $-7.8$	Exotherm: $-21.3$ Endotherm: $-6.4$ , $-6.0$	n.d.
$\text{NaH}$ -Succinate	4.7	Exotherm: $-25.0$ Endotherm: $-8.1$	$T_g$ : $-39.5 \pm 0.7$ Endotherm: $-7.9$	$49.2 \pm 3.7$
Succinic Acid	2.8	Unclear	Exotherm: $-17.6$	$42.0 \pm 8.2$

構造) 固体を形成した (Fig. 2). これらの固体は比較的高い残存水分 (7-9%, w/w, カールフィシャー法) を含み, 非晶質状態にあることが粉末 X 線回折で確認された. また KBr 錠の FT-IR 測定およびバイアル底部からの NIR 測定では, 相互作用を示唆するカルボキシル基およびアミノ基のバンド変化が観察された (Figs. 3, 4). 1,3-ジアミノ・2-ヒドロキシプロパンとクエン酸の共存によるガラス転移温度の上昇は, 両者を物理混合し高温で融解・急速冷却した非晶質固体についても同様に観察され, 相互作用の形成に凍結乾燥で用いる水は必ずしも必要ないことが示された.

タンパク質製剤などの緩衝液成分として用いられる多価カルボン酸とそのナトリウム塩は, 凍結溶液中で非晶質の濃縮相を形成するもの (クエン酸 Na 等) と結晶化による発熱または結晶融解による吸熱を示すもの (コハク酸 Na 等) に分かれた (Table 2). クエン酸や酒石酸の凍結溶液ではナトリウムイオン濃度がカルボキシル基の約半分にあたる領域で最も高い転移温度を示し, 比較的高い  $T_g'$  を持つクエン酸



乾燥固体の物性の関係を求め、相互作用の寄与について検討した。

## 材料および方法

### 1. 試薬

物性検討のモデルとして Table 1 と 2 に示すカルボン酸およびアミン類を用いた。

### 2. 熱測定

試料の熱測定には DSC (Q-10, TA Instruments) を用いた。凍結溶液の熱測定は濃度比の異なるカルボン酸とアミン(計 200 mM)または水酸化ナトリウムを含む試料溶液(10 $\mu$ l)を入れたアルミセルを密封し、-70°C まで 10°C/min で冷却後、5°C/min で昇温測定した。凍結乾燥固体(1.2 mg)はアルミセル中に密封し、-30°C から 5°C/min で昇温測定した。融解急冷による非晶質固体は、アルミセルに密封した試料(1.5-2.5mg)を 165°C で 3 分間融解させた後に液体窒素中で急速冷却して作製し、-50°C から 5°C/min で昇温測定した。各試料の転移温度は 3 回測定の結果を平均値と $\pm$ S.D.で表示した。緩衝液の物性検討にはカルボン酸ナトリウム塩を単独またはウシ血清アルブミン(BSA)の共存する試料を用い、凍結溶液と乾燥固体の熱測定を行った。

Table 1. Structure and Thermal Property of Carboxylic Acids and Amines in Frozen Aqueous Solutions Obtained by Thermal Analysis

	Functional Groups			Property in frozen solutions	
	COOH	OH	NH <sub>2</sub>	Crystallinity	Thermogram
Acetic Acid	1	0	0	Crystallized	Endotherm
Glycolic Acid	1	1	0	Crystallized	Exotherm/Endotherm
DL-Lactic Acid	1	1	0	Amorphous	T <sub>g</sub> ' < -60 °C
Malonic Acid	2	0	0	Crystallized	Endotherm
Succinic Acid	2	0	0	Crystallized	Flat
Glutaric Acid	2	0	0	Crystallized	Flat
Adipic Acid	2	0	0	Crystallized	Exotherm
Pimelic Acid	2	0	0	Crystallized	Flat
L-Malic Acid	2	1	0	Amorphous	T <sub>g</sub> ' < -60 °C
L-Tartaric Acid	2	2	0	Amorphous	T <sub>g</sub> ' : -57.1 °C
Tricarballic Acid	3	0	0	Amorphous	T <sub>g</sub> ' : -52.0 °C
Citric Acid	3	1	0	Amorphous	T <sub>g</sub> ' : -55.1 °C
1-Aminopropane	0	0	1	Crystallized	Endotherm
3-Amino-1-propanol	0	1	1	Amorphous	T <sub>g</sub> ' < -60 °C
1,3-Diaminopropane	0	0	2	Amorphous	T <sub>g</sub> ' < -60 °C
1,4-Diaminobutane	0	0	2	Crystallized	Endotherm
1,6-Diaminohexane	0	0	2	Crystallized	Endotherm
1,8-Diaminooctane	0	0	2	Crystallized	Flat
1,3-Diamino-2-hydroxypropane	0	1	2	Amorphous	T <sub>g</sub> ' < -60 °C

### 3. 凍結乾燥

Freezone-6 型凍結乾燥機(Labconco)を用い、ガラスバイアルに分注した溶液(200 mM, 800  $\mu$ l)を 0.5°C/min で-40°C に冷却して 2 時間保持後、-40°C で 15 時間、-30°C で 6 時間、35°C で 6 時間減圧乾燥した。各設定温度間は 0.2°C/min で昇温した。

### 4. 近・中赤外測定、粉末X線回折、水分量測定

固体の近赤外測定には MPA (Bruker)を用いた。ガラスバイアル中に入れた試料を 4000-12000 cm<sup>-1</sup> の範囲について分解能 4 cm<sup>-1</sup> で底面から拡散反射測定(128 回積算)し、OPUS ソフトウェアを用いて解析した。中赤外測定には FT-IR (MB104, ABB Bomen)を用い、KBr 粉末中に分散・打錠した試料を透過測定(128 回積算)した。凍結乾燥固体の結晶性検討には粉末X線回折装置(Rinf-Altima, リガク)、残存水分測定はカールフィッシャー法(AQV-6, 平沼産業)を用いた。

## 結 果

各種カルボン酸またはアミン類を含む凍結溶液の熱測定では、昇温過程において非晶質状態の濃縮相

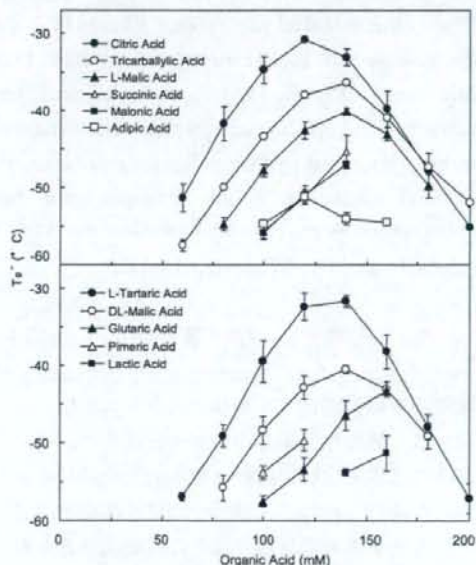


Fig. 1. Glass transition temperatures of the maximally freeze-concentrated phase ( $T_g'$ ) of frozen aqueous solutions containing 1,3-diamino-2-hydroxypropane and various carboxylic acids at various ratios (200 mM total).

## カルボン酸塩の凍結乾燥によるガラス固体化と水素結合の寄与

<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所, <sup>2</sup>東邦大学薬学部  
伊豆津健一<sup>1</sup>, 四方田千佳子<sup>1</sup>, 川西徹<sup>1</sup>, 角谷沙織<sup>2</sup>, 米持悦生<sup>2</sup>, 寺田勝英<sup>2</sup>

## Hydrogen-bonding in Glass-state Ammonium Carboxylate and Alkali-metal Carboxylate Solids

Kenichi IZUTSU<sup>1</sup>, Chikako YOMOTA<sup>1</sup>, Toru KAWANISHI<sup>1</sup>, Saori KADOYA<sup>2</sup>,  
Etsuo YONEMOCHI<sup>2</sup> and Katsuhide TERADA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Health Sciences, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan

The purpose of this study was to elucidate the effect of molecular interactions on the physical properties of frozen aqueous solutions and freeze-dried solids containing various carboxylic acids, amines, and alkali-metal ions. Thermal analysis of frozen solutions containing the multivalent carboxylic acid and amines showed reduced tendency for the solute crystallization and bell-shaped profiles of the glass transition temperature of maximally freeze-concentrated amorphous solutes ( $T_g'$ ) depending on the number of functional groups on the solutes and their concentration ratios. Freeze-drying of the high  $T_g'$  frozen solute-mixture solutions ( $-40^\circ\text{C} < T_g'$ ) resulted in cake structure amorphous solids that have the glass transition temperatures ( $T_g$ ) much higher than the individual components. Network of electrostatic interactions and hydrogen-bonding between the amino and carboxyl groups, as well as anion network of strong "single hydrogen-bond" between the differently protonated carboxyl and carboxylate groups, should explain the high transition temperatures ( $T_g'$ ,  $T_g$ ) of the frozen solutions and the freeze-dried solids. (Received Sep. 3, 2008; Accepted Dec. 11, 2008)

## 結 言

水溶液の凍結乾燥により形成するガラス状態の非晶質固体は、難溶性医薬品の溶解性改善やタンパク質医薬品の工程および保存安定性の向上をはじめとする様々な機能を持つ。二糖類や水溶性高分子など非イオン性物質の非晶質固体はその基礎物性ととも

に各種の応用例が報告されており、特にトレハロースおよびシロ糖は優れた添加剤として多くの製剤で活用されている。一方で各種有機物の塩がガラス固体を構成することは古くから知られ、アミノ酸塩の一部は低温保護剤として用いられてきたが、物性についての系統的な検討例は一部にとどまってきた<sup>1-4)</sup>。このため塩が持つ非イオン性物質に比べ多様な特性を把握・制御し、ガラス固体の応用を広げることが期待される。本研究ではカルボン酸とアミン類またはアルカリ金属イオンにより形成する塩について、官能基数など物質の構造と、凍結水溶液および凍結

第54回低温生物工学会研究報告 6.

[Key words: Freeze-drying, Hydrogen-bonding, Salt; 凍結乾燥, 水素結合, 塩]



質問(3) 申請時、技術移管の際に、研究室間の測定値の差、或いは規格外 (OOS) が発生したなど浸透圧計に起因する問題事例があれば記載してください。具体的な製品名などは不要です。

注射剤の容量： (    mL) 浸透圧比： (    ) ~ (    ) 粘度：約 (    )

- 測定値の差、OOSは規格値の上限あるいは下限のどちらで発生しましたか。上限 (    ) 下限 (    ) 傾向はない (    )
- 測定値の差、OOSが発生した際の使用標準液のオスモル濃度。 (    mOsm)
- 想定されるオスモル濃度と実際の測定値とのズレの度合い。 (    mOsm)

測定値の差、OOS発生等に関してご意見があればお願いします。

質問(4) 本研究にご参加頂くことは可能ですか。

(    ) 参加可能                      (    ) 参加不可能

質問(4)で参加可能とお答えいただいた会社のご連絡先について、次にご記入をお願いします。

御社名・部署名			
担当者名			
ご連絡先	住所		
	電話・FAX	電話	FAX
	e-mail		

ご協力ありがとうございます。

(このアンケートに記載されました氏名及び連絡先は本研究を進める上での連絡以外には使用いたしません。)

以上

(別紙2)

調査用紙：

ご回答者

氏名：  
連絡先 (e-mail)：

会社名：

質問(1) 現在ご使用中の「凝固点降下法を用いた浸透圧計」について記載してください。

①機器名	②型式	③冷却機構	④メーカー名	⑤取り扱い又は輸入代理店名	⑥代理店の連絡先
1.					
2.					
3.					

(③冷却機構について： 1. 冷媒を使用 2. ペルチエ効果を利用した物理的な冷却 3. わからない のいずれかの番号をご記入ください)

質問(2) 校正・測定について 該当個所に○印か具体的な名称等を記載してください。

校正に用いる標準液	機器メーカー提供品使用 ( )	日局に準じて自家調製 ( )	第3者機関供給品 ( )
試料のセッティング方式	試料容器を冷却する ( )	ノズルから試料を吸引 ( )	その他 ( )
試料容器を冷却する場合	試料量はホールピペットなどで正確に入れる ( )		容器の肩までなど目分量 ( )
校正・測定に関して疑問・問題などご意見があればお願いします。			