

Table 3 製薬各社から寄せられた疑問・問題点・要望

No.	疑問・問題点・要望
1	JP15では装置校正用オスモル濃度標準液の上限が1000 mOsm標準液となっており、校正液として100 mOsm及び1500 mOsmを用いる仕様となっている機種は、JP対応機種とは言い難い状況がある。3000 mOsm程度の濃度の高い標準液を設定して欲しい。
2	校正に用いる標準液は、メーカーから日局に準じた標準液を市販するように要請して欲しい。
3	200 mOsm標準液を調製・使用しているが、塩化ナトリウム0.946 gを正確に量ることが困難なため、正確な200 mOsm標準液が調製できているのか不安がある。
4	日本薬局方に準じた装置の適合性確認の際、100 mOsm、300 mOsmの再現性が得られにくく、再度自家調製した標準液を用いて実施し適合するといったケースがある。
5	①以前に使用していた機種で、生理食塩液の浸透圧が測定日より3%程度ずれることがあった（同じロットのアンブルのため生理食塩液自体の浸透圧のずれはほとんど無いと考えられる）。製剤評価において生理食塩液に対する浸透圧比を求める場合に問題と思われる。 ②モル凝固点降下を示さないグリセリン等を含む製剤も多く、それらの浸透圧を測定できる機器の開発が必要である。
6	機器メーカーから供給される標準液が、日本薬局方の規定に対応していないため、標準液を自家調製するしかない状況に不便を感じている。
7	1000 mOsmを超える浸透圧を有する製品を測定する際に、希釈係数で補正しても、既に物性値として広く知れ渡っている希釈前の浸透圧と差があったため、希釈後の測定への変更を見合わせている。そのため、日本薬局方に規定されていない標準溶液を用いる測定となっている。
8	熱伝導液（冷媒）を循環する方式の装置を使用しているが、使用頻度が少ないため（1～2週間に1回程度）、熱伝導液がラインで結晶化して詰まり熱伝導液が循環しないことがある。
9	校正に用いる標準液(2000, 2500 mOsm)を自家調製した際、機器メーカーより購入した標準液の測定値との差異を認めた事があった。標準液を調製する際の溶解に使用する水の温度等の注意すべき点を明確に記載した事項が必要でないか。
10	試料のセッティング方式が吸引式の装置では、高粘性の試料が吸引出来ず、測定ができない。
11	校正値には、規格範囲（100±1 mOsm、500±3 mOsmなど）を規定する必要がある。また、校正値がどのような計算方法で算出されているのか出典を明らかにして欲しい。
12	100, 1500 mOsmの固定の2点校正を実施する装置で、1500 mOsmは15局の装置校正用オスモル濃度標準液にないため（またメーカー提供品のため組成も不明）、厳密には局方に従った校正をしていない。装置の適合性に適合することを確認した上で、試験実施している。 装置の校正濃度の変更可能ではあるが、メーカーの推奨が100, 900 mOsmの2点校正となっている場合に、校正は試料の測定ごとに予想される試料のオスモル濃度を挟む二種の装置校正用オスモル濃度標準液で校正を行う必要があるのか。 予想される試料のオスモル濃度を挟む標準液濃度には、直近の標準液濃度を使用する必要があるか。それとも広い範囲で考えて100 mOsmと1000 mOsmを用いて行ってもよいか。 また、適当な期間ごと（3カ月ごとあるいは6カ月ごと等）に校正を実施し、装置の適合性から外れた場合には、その都度実施する等の運用ができないか。 装置の適合性で確認を行うため、校正の方法を詳しく規定する必要はなく、メーカー推奨の方法に従ってもよいのではないか。

100 と 1000 mOsm の日本薬局方の標準液を調製して使用するかのどちらでも良いとした。

### 3.2.2 試料の測定

試験まで冷蔵（2～8℃）保管とし、測定の数時間前に試験室に取り出し、液温が常温に戻るまで放置

Table 4 浸透圧測定に関わる製薬会社での問題事例

No.	問題事例
1	同一ロットの製剤の浸透圧を測定した際、海外の製造元で約940 mOsmであり、日本では約1000 mOsmであった経験がある。
2	製品の試験を外注した際に、凍結せず測定不能といわれた経験がある（製品の浸透圧比 2.3~3.3, 37°Cにおける粘度約4.4mPa·s）。このとき、製品に不溶の物質であるタルクを添加して測定可能となった。
3	日本薬局方では「二点校正は予想される試料のオスモル濃度を挟む」となっているが、技術移転先所有の装置は50と850 mOsm固定で校正しているため（メーカー推奨であり、変更不可）、900~1000 mOsmの試料を測定する際、日本薬局方どおりに測定するためには、溶液を希釈するよう試験法を変更する必要があった（技術移転元所有の装置は900と1500 mOsmで校正可能のものを使用）。しかし、移転先の装置は定期検査実施時（6カ月毎）には、2000 mOsmまで測定可能なことを確認し、使用時には測定オスモル濃度付近の正確さと精度を確認しているため、試験法を変更することなく技術移転を実施したが、値は移転元と比較し高め（浸透圧比で0.1）であった。技術移転元においても実測値は暫定規格に対して、上限付近であったため、技術移転に苦勞した。

Table 5 浸透圧測定用標準試料の調製表<sup>6,7)</sup>

(水300.000 gに溶かす量)

オスモル濃度 (mOsm)	塩化ナトリウム (g)	ショ糖 (g)
200	1.878	20.232
300	2.838	30.054
400	3.810	39.639
500	4.779	49.002
700	6.714	67.128
1000	9.669	92.976

し、常温の精製水と2系列（各6濃度）の標準試料の合計13試料について繰り返し2回の浸透圧の測定を依頼した。

### 3.3 結果

塩化ナトリウム及びショ糖の標準試料での測定結果をTable 6及びTable 7に示す。また、横軸に調製時の浸透圧標準オスモル濃度、縦軸に測定値をプロットした。

その結果、塩化ナトリウム標準試料ではすべての機種で回帰式の傾きは0.9813~1.0139と良く、相関係数(r)も0.9998以上と良い相関を示していた(Fig. 4)。それに比べ、ショ糖標準試料では、回帰式の傾きが0.9907~1.1561と期待値の1より上方にずれる傾向のある装置があった(Fig. 5)。

ショ糖標準試料について、装置メーカー毎に分類した結果、アドバンス社の装置とプレジジョン社の

装置をプールした群では0.9907~1.0220であったのに対し(Fig. 6)、アークレイ社の装置では1.0964~1.1561、ゴノテック社(OEMのフォーゲル社を含む)の装置では1.0920~1.1324で上方にずれる傾向であった(Fig. 7)。フィスケ社の装置では1.0143~1.0461とやや上方にずれる傾向であった。国内製薬会社での保有実績が殆ど無いレーベリング社の装置は国内代理店の協力により1例、すでに製造販売が中止されている東亜DKK社の装置についても1例のデータ収集であるが、両社とも各々1.0797及び1.1231と上方にずれる傾向のものであった。なお、すべての装置毎のショ糖標準試料の測定結果の相関係数(r)は0.9984以上とばらつきは小さく相関も良好であった。

また、ショ糖標準試料の1000 mOsmにおいて凍結しないエラーが、特定の装置メーカーによること

Table 6 塩化ナトリウム標準試料を用いた

メーカー	型式	参加会社	0	200	300	400				
フォーゲル	OM801	1	1	1	199	198	297	297	398	398
	OM802	2	1	0	198	201	298	300	400	401
	OM802-D	3	2	0	201	203	302	303	401	402
		4	1	1	198	201	299	301	400	397
ゴノテック	030-D	5	0	0	200	200	300	301	400	398
	030-D-RS	6	7	1	200	201	282	301	401	398
	030-DRS3P	7	0	0	200	199	300	302	400	399
		8	1	1	200	201	296	297	396	397
アドバンス	3D3	9	0	0	199	199	301	301	403	402
		10-1	0	0	197	197	298	298	399	400
		11	0	0	196	197	296	294	397	400
		12	0	0	197	197	300	300	401	402
	13	0	0	197	195	299	298	401	400	
	3900	14	0	0	193	195	299	299	400	400
プレジジョンシステムズ	A5002	15-1	0	0	201	201	300	299	400	398
		16	-2	-2	201	199	299	299	399	397
	5004	17	0	-1	201	202	300	301	401	399
	XL5007	18	1	1	200	201	299	300	400	401
16-1		0	0	198	200	298	295	394	395	
アークレイ	OM6030	19	0	0	199	200	299	299	399	400
	OM6040	20	0	0	198	198	297	297	398	397
		21	0	0	199	199	300	300	401	400
		10-2	0	0	200	201	301	301	403	403
		22	0	0	200	199	299	300	401	402
		23	0	0	198	198	299	301	400	401
		24	1	1	201	201	301	300	401	401
	OM6050	25	0	0	200	201	300	302	402	404
		26	0	0	198	199	299	300	402	404
	OM6060	27-1	0	0	198	198	298	298	399	399
		15-2	0	0	200	200	301	301	402	402
		16-2	-	-	202	202	304	304	406	406
28		0	0	198	198	299	299	401	401	
フィスケ	Mark3	29	0	0	200	200	300	301	401	401
		27-2	0	0	201	200	300	299	400	400
	2400	30	0	0	186	190	291	291	394	399
		31	0	0	197	200	314	300	403	401
	One-Ten	32	0	0	197	200	314	300	403	401
		33	0	0	199	198	297	296	398	400
T-FI-001	34	0	0	197	198	297	299	400	400	
日機装	OSA-21	35-1	0	0	200	200	300	299	401	402
	OSA-22	35-2	0	0	200	200	300	299	402	401
クナウワ	D	36	0	0	195	196	295	297	391	392
レーベリング	F-2000	37	0	0	198	198	297	298	399	398
東亜DKK	HOSM-1	38	0	1	200	200	301	300	402	401

なく比較的多く報告された。

シヨ糖標準試料での回帰式の傾きに関して、アドバンス社とプレジジョン社の装置の結果をプールした群とアークレイ社、ゴノテック/フォーゲル社及びフィスケ社の3組の装置の結果について統計的に

差があるか、回帰式について非平行性を確認する検定を行った。検定は2群の群別回帰式の回帰係数を比較し、共通回帰から非平行性までの因子で説明しきれない共分散分析での誤差とF検定を実施した。

その結果、Table 8に示すように、アークレイ社

各社浸透圧計での測定結果（単位：mOsm）

500		700		1000		y切片	傾き	相関係数
496	495	693	693	989	991	0.9902	0.9891	1.0000
498	496	697	696	992	991	1.6848	0.9912	1.0000
501	500	700	698	1000	997	2.3413	0.9963	1.0000
496	502	697	696	990	994	1.8935	0.9914	1.0000
502	500	700	699	996	999	0.6489	0.9977	1.0000
505	499	694	696	996	991	1.6728	0.9917	0.9998
499	500	698	701	996	997	0.7772	0.9968	1.0000
498	498	687	694	994	997	0.2837	0.9924	1.0000
502	502	701	702	1009	1010	-1.6848	1.0088	1.0000
499	499	698	697	1006	1006	-2.9076	1.0056	1.0000
501	501	700	698	1005	1005	-3.5543	1.0064	1.0000
499	502	700	705	1010	1014	-3.4772	1.0122	1.0000
501	499	703	703	1009	1009	-3.6837	1.0106	1.0000
500	499	700	700	1008	1006	-3.7587	1.0083	1.0000
498	498	695	695	997	998	0.5402	0.9956	1.0000
500	500	697	700	1001	999	-1.4196	1.0011	1.0000
498	497	690	691	982	984	4.3413	0.9813	1.0000
502	501	692	692	985	986	4.3337	0.9839	1.0000
498	496	691	683	986	982	1.7163	0.9826	1.0000
501	501	699	700	998	998	0.1065	0.9986	1.0000
497	497	694	694	994	995	-0.6109	0.9943	1.0000
503	501	701	700	999	1009	-0.9576	1.0041	1.0000
504	503	701	702	1000	1001	-1.1109	1.0007	1.0000
503	502	700	700	999	999	0.4783	0.9996	1.0000
500	499	700	694	1006	1007	-2.0000	1.0050	1.0000
502	502	699	699	1000	1001	1.1620	0.9990	1.0000
501	504	701	702	1000	1007	0.3087	1.0032	1.0000
502	504	702	709	1007	1013	-2.2446	1.0114	1.0000
498	497	698	696	997	997	-0.7348	0.9973	1.0000
504	504	704	704	1005	1009	-0.7500	1.0075	1.0000
508	507	706	707	1004	1005	3.8268	1.0024	1.0000
503	503	702	702	1007	1004	-1.7076	1.0066	1.0000
502	502	700	699	1006	1002	-0.4152	1.0032	1.0000
501	502	700	699	1007	1004	-1.0739	1.0045	1.0000
496	489	694	691	999	1003	-7.2185	1.0039	0.9999
504	502	701	705	1020	1012	-1.9424	1.0139	0.9999
504	502	701	705	1020	1012	-1.9424	1.0139	0.9999
497	499	701	699	999	1001	-1.6772	1.0012	1.0000
499	498	697	699	1006	1006	-2.7359	1.0055	1.0000
500	501	701	703	1003	1005	-0.8011	1.0042	1.0000
502	501	702	702	1005	1004	-0.8130	1.0047	1.0000
490	492	692	693	989	991	-2.1804	0.9909	1.0000
498	498	697	697	1001	1003	-2.0511	1.0017	1.0000
500	500	699	698	998	995	1.4576	0.9959	1.0000

及びゴノテック/フォーゲル社の装置の結果では5%危険率でアドバンス社とプレジジョン社の装置の結果をプールした群と平行ではなく傾きに有意差があり、フィスケ社の装置の結果には有意差は認められなかった。

以上のことから、塩化ナトリウム標準試料並びにショ糖標準試料の測定値は、それぞればらつきが小さく再現性良く測定できているが、機種間差のあることがわかった。

アークレイ社及びゴノテック社（OEMのフォー

Table 7 ショ糖標準試料を用いた各社

メーカー	型式	参加会社	0		200		300		400	
フォーゲル	OM801	1	1	1	206	205	308	305	415	415
	OM802	2	1	0	202	206	310	307	422	426
	OM802-D	3	2	0	209	205	311	310	416	415
		4	1	1	208	207	316	315	420	421
ゴノテック	030-D	5	0	0	205	206	307	309	422	412
	030-D-RS	6	7	1	206	203	313	308	415	415
	030-DRS3P	7	0	0	206	204	308	310	414	415
		8	1	1	206	203	311	311	416	413
アドバンス	3D3	9	0	0	202	202	306	306	409	408
		10-1	0	0	202	202	306	305	408	408
		11	0	0	197	196	298	296	404	402
		12	0	0	201	202	304	306	407	408
		13	0	0	201	199	305	304	406	400
	3900	14	0	0	201	201	305	305	406	406
プレシジョンシステムズ	A5002	15-1	0	0	199	199	301	302	401	402
		16	-2	-2	201	201	304	302	403	403
	5004	17	0	-1	206	205	309	308	407	409
	XL5007	18	1	1	204	204	303	305	404	406
		16-1	0	0	199	200	302	298	399	398
アークレイ	OM6030	19	0	0	205	206	308	307	411	412
	OM6040	20	0	0	203	202	306	309	409	415
		21	0	0	204	204	309	310	418	412
		10-2	0	0	204	205	312	306	416	415
		22	0	0	203	205	310	309	414	420
		23	0	0	202	204	304	309	415	412
		24	1	1	205	205	311	311	416	420
		25	0	0	206	207	312	307	417	412
		26	0	0	208	211	318	318	425	430
	27-1	0	0	204	204	304	305	413	411	
	OM6050	15-2	0	0	203	205	309	308	418	415
		16-2	-	-	205	207	316	314	418	423
		28	0	0	204	202	308	309	408	416
		29	0	0	206	204	309	311	413	412
	OM6060	27-2	0	0	204	206	311	310	415	413
フィスケ	Mark3	30	0	0	196	196	296	300	400	400
	2400	31	0	0	204	203	308	309	412	412
	One-Ten	32	0	0	204	204	306	304	409	408
		33	0	0	208	208	311	311	423	422
	T-FI-001	34	0	0	198	200	304	303	406	408
日機装	OSA-21	35-1	0	0	203	202	304	306	411	411
	OSA-22	35-2	0	0	204	203	306	308	406	408
クナウワ	D	36	0	0	204	202	303	304	403	406
レーベリング	F-2000	37	0	0	203	202	305	306	410	410
東亜DKK	HOSM-i	38	0	1	209	206	309	306	411	419

ゲル社を含む)の装置は、ショ糖溶液では、浸透圧比が約1, 即ち等張付近では顕著に見えないものの、高浸透圧領域のオスモル濃度で10%程度上にずれる傾向があることがわかった。レーベリング社及び東亜DKK社の装置については各1機種ずつしか測

定結果が収集できなかったが、同様の傾向があることが懸念される。

したがって、高浸透圧領域のオスモル濃度ではショ糖という汎用されている糖水溶液において浸透圧計に機種間差があることが判明した。

浸透圧計での測定結果（単位：mOsm）

500		700		1000		y切片	傾き	相関係数
515	516	746	744	1113	1110	-19.430	1.1084	0.999
520	522	756	748	1113	1114	-18.191	1.1132	0.9993
515	521	747	745	1088	1113	-15.139	1.0982	0.9993
523	527	750	754	1114	1108	-14.826	1.1085	0.9994
526	523	751	750	1097	1124	-18.165	1.1107	0.9992
526	521	745	744	1092	1097	-12.652	1.0920	0.9995
525	525	758	751	1136	1132	-24.045	1.1324	0.9988
523	525	750	740	1121	1119	-19.837	1.1158	0.9990
509	508	709	709	1014	1011	1.213	1.0123	1.0000
506	507	710	708	1017	1009	0.683	1.0127	1.0000
501	504	706	707	1010	1010	-3.538	1.0130	1.0000
510	511	714	716	1018	1023	-1.186	1.0220	1.0000
505	502	693	704	1009	-	0.399	1.0044	0.9999
505	506	708	708	1007	1005	1.467	1.0068	1.0000
500	499	701	699	994	995	1.537	0.9952	1.0000
508	506	706	702	1027	-	-3.870	1.0210	0.9999
507	508	704	709	1005	1000	4.875	1.0013	0.9999
506	509	706	705	1000	1003	3.749	1.0007	1.0000
495	501	696	699	992	988	1.783	0.9907	1.0000
512	523	732	747	1104	1109	-18.695	1.1029	0.9991
516	511	752	744	1121	1122	-23.693	1.1196	0.9987
518	531	741	751	1126	1136	-23.241	1.1267	0.9987
520	523	729	725	1102	1107	-16.692	1.0964	0.9990
523	533	758	746	1121	1119	-20.157	1.1199	0.9992
511	511	730	721	1120	1101	-20.539	1.1012	0.9985
520	521	772	752	1121	1143	-22.757	1.1319	0.9988
530	521	741	748	1161	1128	-25.551	1.1367	0.9981
541	539	775	761	1156	1163	-23.058	1.1561	0.9988
524	524	755	752	1133	1145	-27.093	1.1376	0.9985
519	517	781	745	1118	1096	-18.836	1.1125	0.9991
529	538	758	764	1125	-	-29.912	1.1396	0.9996
520	518	754	744	1116	1095	-19.036	1.1065	0.9992
513	528	721	731	1109	1111	-18.168	1.1004	0.9987
520	514	732	729	1123	1129	-22.015	1.1152	0.9983
501	504	706	704	1012	1012	-4.387	1.0143	1.0000
515	521	729	729	1018	1051	-1.863	1.0382	0.9998
518	521	720	738	1060	1013	-3.457	1.0409	0.9995
527	525	730	729	-	-	0.031	1.0461	0.9999
506	506	711	711	1011	1014	-0.884	1.0146	1.0000
513	510	703	705	1003	998	4.813	1.0003	0.9999
512	510	712	710	1006	1007	3.250	1.0075	1.0000
501	503	700	699	1000	997	3.102	0.9965	1.0000
514	516	735	733	1075	1085	-14.279	1.0797	0.9996
515	523	742	738	1132	1131	-22.934	1.1231	0.9984

4. 考 察

(1) アンケートの結果では、浸透圧測定における機種間差を認識している実態は、2社に留まった。これは技術移転等のような場合にも異なったメーカーの装置を使用することが少ないこと、

また、高浸透圧比（高オスモル濃度）の注射剤が少ないことに起因していると思われた。

(2) 浸透圧測定法の課題として、校正あるいは日局の標準液と装置メーカーから供給される標準液との適合性に関する意見が多く見受けられた。

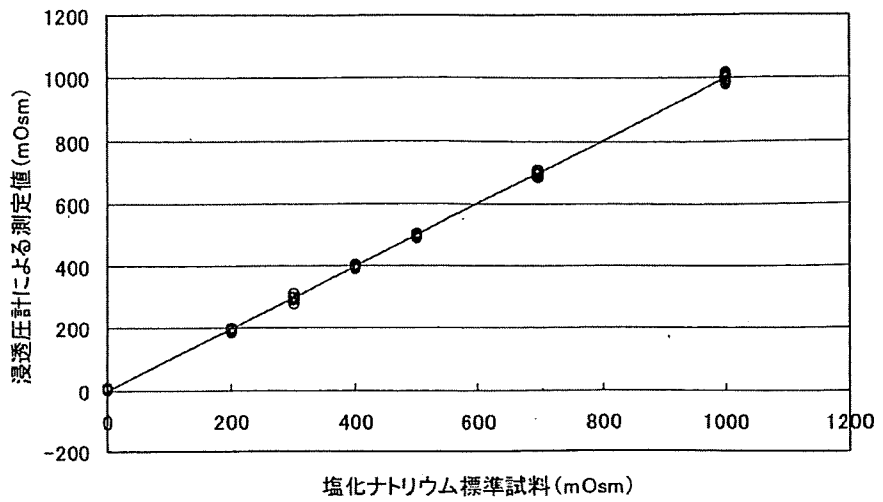


Fig. 4 塩化ナトリウム標準試料の測定結果（全体 41 機種）

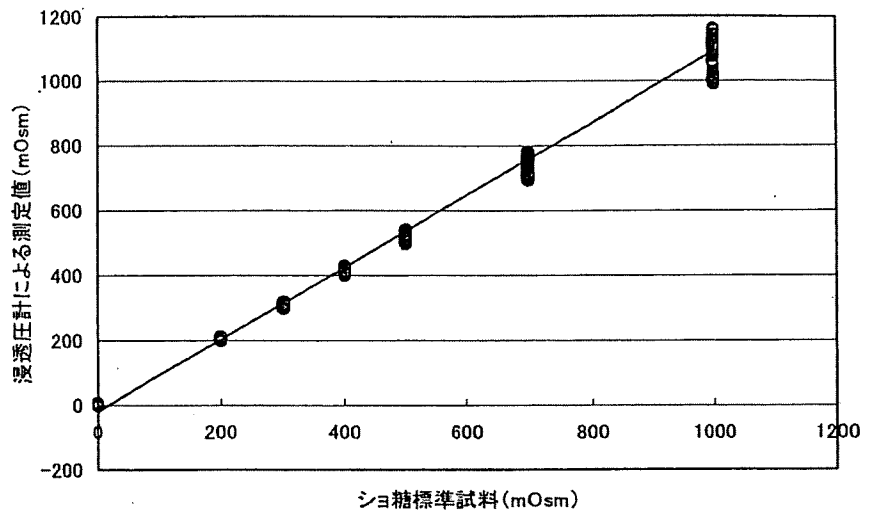


Fig. 5 シヨ糖標準試料の測定結果（全体 41 機種）

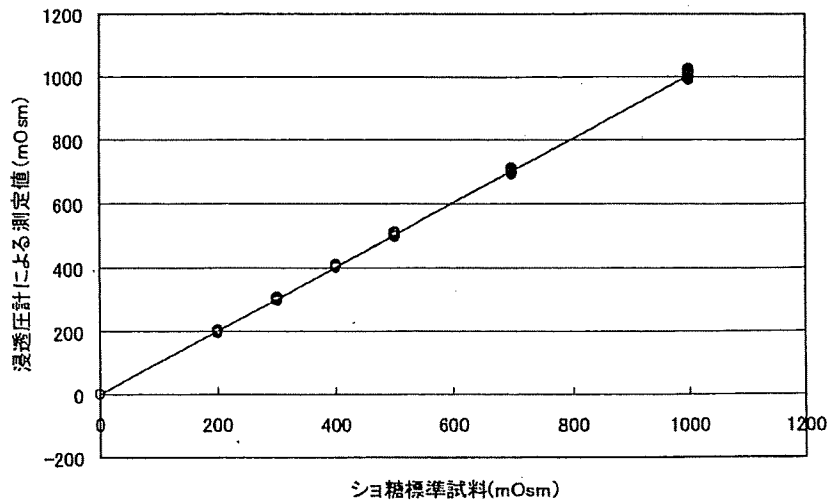


Fig. 6 シヨ糖標準試料の測定結果（アドバンス社・プレシジョン社 11 機種）

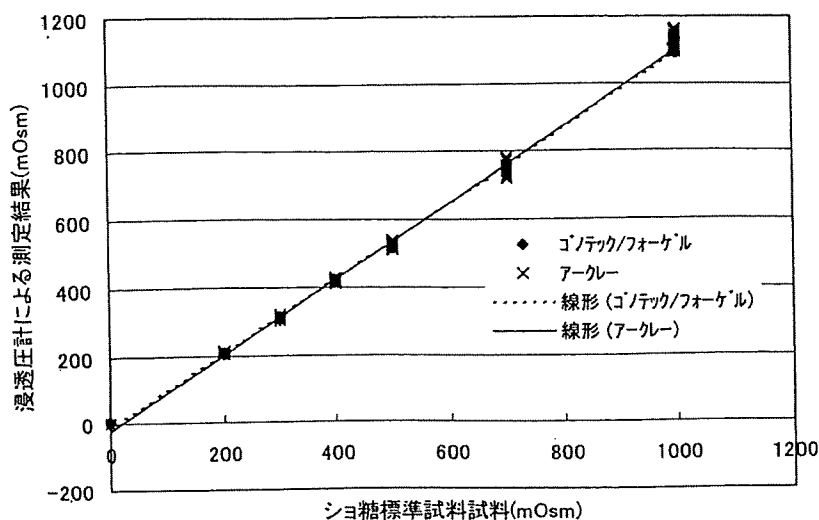


Fig. 7 ショ糖標準試料の測定結果（アークレイ社・ゴノテック/フォーゲル社 23 機種）

Table 8 ショ糖での回帰式の傾きの平行検定結果

比較メーカー	アドバンス/プレジジョンとの平行性
アークレイ	$F_0=517.9(P=0.035) > F(0.05, 358, 1)=254.0$
ゴノテック (OEMのフォーゲルを含む)	$F_0=423.6(P=0.039) > F(0.05, 261, 1)=253.8$
フィスケ	$F_0=17.52(P=0.189) < F(0.05, 205, 1)=253.7$

(3) 今回の共通試料を用いた共同実験結果から、高浸透圧オスモル濃度で浸透圧測定値に機種間差を認めた。今後は、市販製剤を用いて機種間差の実態を確認し、医薬品の規格に与える影響について明らかにする必要があると思われた。

### 5. 謝 辞

本研究を実施するに当たり、アンケート調査並びに実験にご協力いただきました(株)東京医薬品工業協会の局方委員会及び点眼剤研究会、大阪医薬品協会の技術研究委員会及び点眼剤研究会に加盟している多くの製薬会社、並びに装置メーカー各社の方々に深く感謝申し上げます。そして、データ集計等にご協力いただきました(株)東京医薬品工業協会の寺田三郎氏にお礼申し上げます。

なお、本実験研究にご協力いただいた製薬各社及び研究者名は次の通りである（敬称略，五十音順）。

- 1 旭化成ファーマ(株)
- 2 あすか製薬(株)

- 守本 成紀
- 三浦 克浩

- 3 アストラゼネカ(株)
- 4 エーザイ(株)
- 5 (株)大塚製薬工場
- 6 大原薬品工業(株)
- 7 (株)オフテクス
- 8 キッセイ薬品工業(株)
- 9 グラクソ・スミスクライン(株)
- 10 三共エール薬品(株)
- 11 参天製薬(株)
- 12 塩野義製薬(株)
- 13 (株)資生堂掛川工場
- 14 (株)住化分析センター

- 15 生化学工業(株)
- 16 ゼリア新薬工業(株)

- 青木 広記
- 池内 孝之
- 柵木 政昭
- 美好 雅文
- 江口 寿
- 前田 至主
- 八木 幹一
- 藤井 隆司
- 土屋依久雄
- 竹内 雄一
- 高瀬 健郎
- 熊田 泰之
- 宮城 章吾
- 川北 敏夫
- 岡田 貞子
- 佐藤 隆俊
- 玉置 富美
- 熊本 典子
- 瀧森 純
- 島山 勇生



17 大正製薬(株)	三浦 哲輔	1 アークレイ マーケティング(株)	山下 章吾
18 大日本住友製薬(株)	高寺喜久雄	2 朝日ライフサイエンス(株)	小杉 武夫
19 田辺製薬(株)	中田 誠二		渡邊 雄太
20 テルモ(株)	北條 智行	3 (株)アムコ	吉新 登
21 東菱薬品工業(株)	齋藤 育子		川端 信希
22 東和薬品(株)	菅野 隆行	4 日機装(株)	川村 堯夫
	半田 利恵		本杉 広二
23 (株)ニデック	杉浦 雅彦		田村 香里
24 ニプロファーマ(株)	石賀 肇	5 (株)ヤナコ機器開発研究所	服部 隆俊
25 日本アルコン(株)	中島 好崇		
26 日本化薬(株)	小林 伸一		
	青山けい子		
27 (株)日本点眼薬研究所	田中 充生		
28 日本ベーリンガーインゲルハイム(株)	林 美則		
	深谷 剛稔		
29 光製薬(株)	黒松真希子		
30 扶桑薬品工業(株)	余田 光		
31 持田製薬(株)	猶塚 正明		
32 ヤンセンファーマ(株)	勝又多津子		
33 わかもと製薬(株)	秋葉 清		
	下田 朝之		

## 文 献

- 1) 坂下 隆, 清水禮治, 上野政一, 綱川延孝, 田村文造: 医薬品研究, 17(6), 1247-1259 (1986).
- 2) 鳴林三郎: 医薬品研究, 26(8), 674-678 (1995).
- 3) 岡田敏史: 医薬品研究, 27(9), 639-643 (1995).
- 4) 奥田秀毅, 松尾賢明, 外岡弘道, 岡田敏史: 医薬品研究, 29(12), 904-912 (1998).
- 5) Robinson, R. A. and Stokes, R. H.: Electrolyte Solutions, 2<sup>nd</sup> Ed. (Revised), Butterworths (1970), p. 29.
- 6) Kiyosawa, K.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 61, 633-642 (1988).
- 7) 厚生労働省: 第十五改正日本薬局方, 2006, p. 43-44.

また、本実験研究にご協力いただいた装置、メーカー各社及び担当者名は次のとおりである（敬称略、五十音順）。

(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 ( )	第三者機関供給品 (機関名： )
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。			

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

住所

ご連絡先

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

## 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)

## 緒 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ョ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]

乾燥固体の物性の関係を探め、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	$T_g < -60^\circ\text{C}$
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	$T_g < -60^\circ\text{C}$
L-Tartaric Acid	2	2	0	Amorphous	$T_g: -57.1^\circ\text{C}$
Tricarballic Acid	3	0	0	Amorphous	$T_g: -52.0^\circ\text{C}$
Citric Acid	3	1	0	Amorphous	$T_g: -55.1^\circ\text{C}$
1-Aminopropane	0	0	1	Crystallized	Endotherm
3-Amino-1-propanol	0	1	1	Amorphous	$T_g < -60^\circ\text{C}$
1,3-Diaminopropane	0	0	2	Amorphous	$T_g < -60^\circ\text{C}$
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	$T_g < -60^\circ\text{C}$

### 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  $\text{cm}^{-1}$  の範囲について分解能 4  $\text{cm}^{-1}$  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

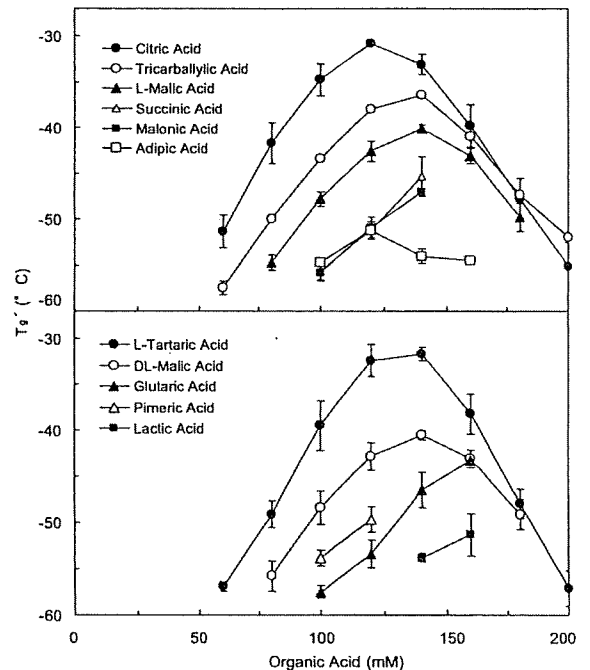


Fig. 1. Glass transition temperatures of the maximally freeze-concentrated phase ( $T_g'$ ) of frozen aqueous solutions containing 1,3-diamino-2-hydroxypropane and various carboxylic acids at various ratios (200 mM total).

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

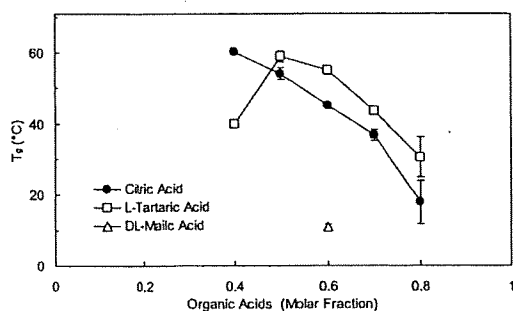


Fig. 2. Glass transition temperatures ( $T_g$ ) of freeze-dried solids containing 1,3-diamino-2-hydroxypropane and organic acids (200 mM total).

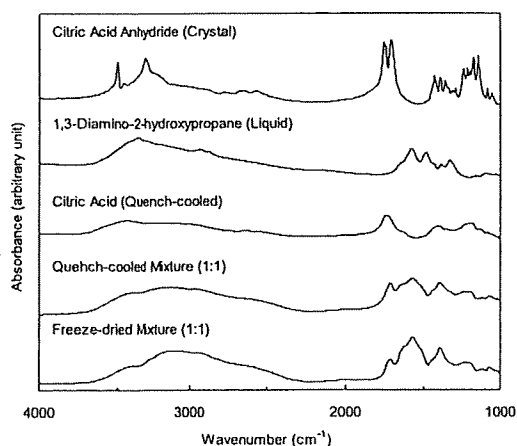


Fig. 3. FT-IR spectra of solids containing 1,3-diamino-2-hydroxypropane, citric acid, and their mixture (1:1 molar ratio).

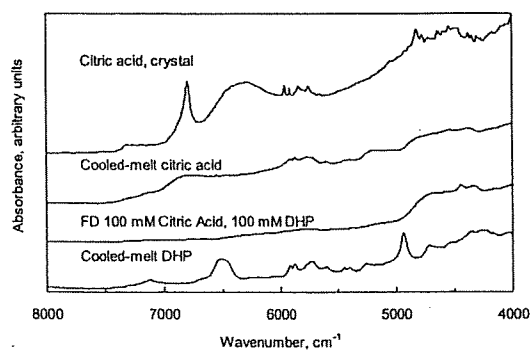


Fig. 4. Diffuse-reflection near-infrared spectra of solids containing 1,3-diamino-2-hydroxypropane, citric acid, and their freeze-dried mixture.

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: $-8.4$ , $-6.0$	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: $-17.6$	$42.0 \pm 6.2$

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  $\text{Na}$  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  $\text{Na}$  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

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った。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>5)</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

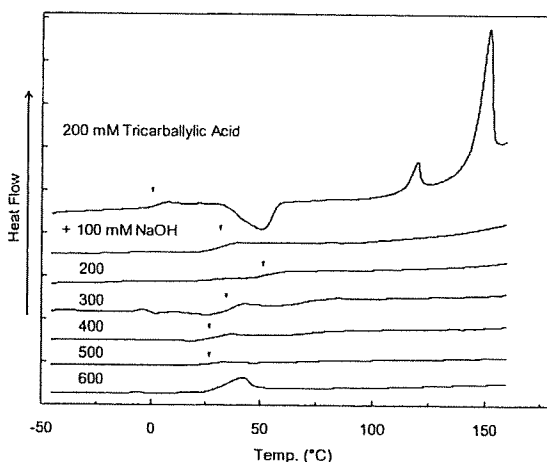


Fig. 5. Effect of sodium hydroxide on the thermal profile of co-lyophilized tricarballylic acid (200 mM). Arrows indicate glass transition temperature of the amorphous solid.

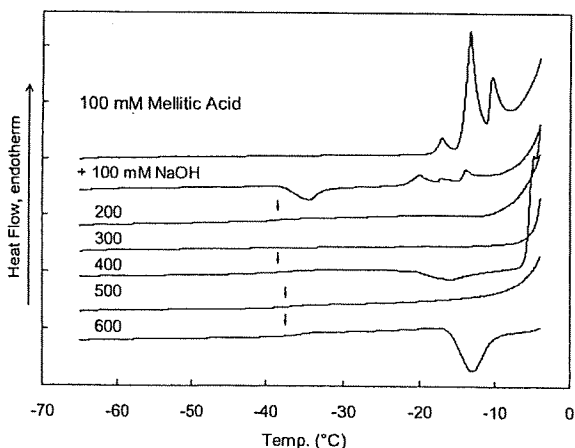


Fig. 6. Effect of sodium hydroxide on the thermal profile of frozen aqueous mellitic acid solutions (200 mM).

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>6)</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思われる. 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,  $-40^{\circ}\text{C}$  以下の乾燥は一般的な凍結乾燥機の能力を超えるとともに, 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. また室温に比べ充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 Zograf, 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)





## 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.kojimajpn@yahoo.co.jp](mailto:tak.kojimajpn@yahoo.co.jp) (T. Kojima).

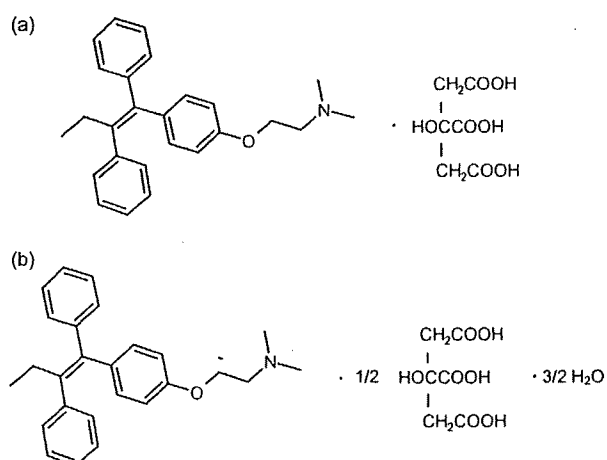


Fig. 1. Chemical structure of tamoxifen citrate (a) and tamoxifen hemicitrate sesquihydrate (b).

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.

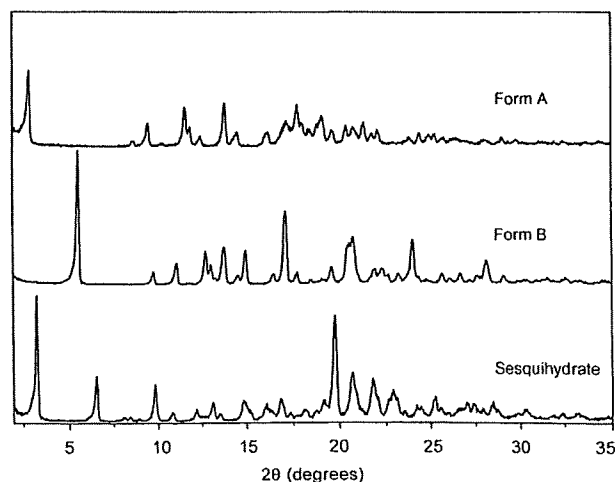


Fig. 2. PXRD patterns of forms A and B, and the hydrate.

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° (2 $\theta$ ), 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-

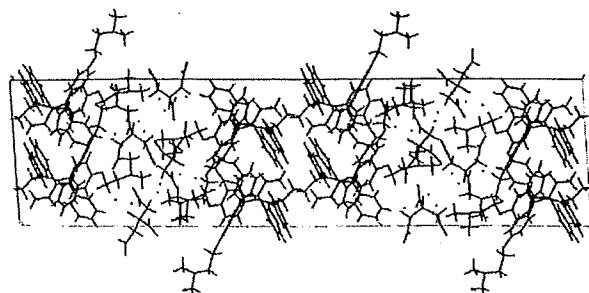


Fig. 3. Crystal structure of the hydrate.

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° (2 $\theta$ ). 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.

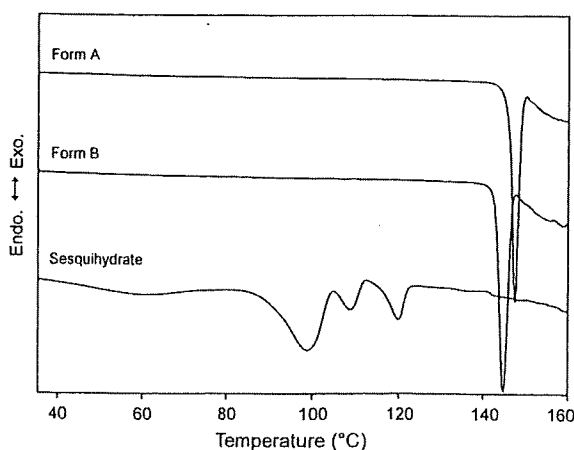


Fig. 4. DSC thermograms of forms A and B, and the hydrate.

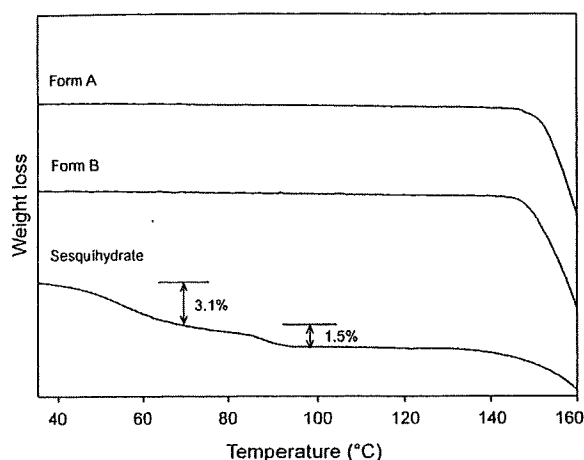


Fig. 5. TGA thermograms of forms A and B, and the hydrate.

### 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° (2θ) of tamoxifen hemicitrate sesquihydrate (Fig. 2) on the PXRD pattern at 32.0–33.8 °C disappeared and a new peak at 20.2° (2θ) 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° (2θ) also disappeared and then a separate new peak at 19.5° (2θ) 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° (2θ) 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

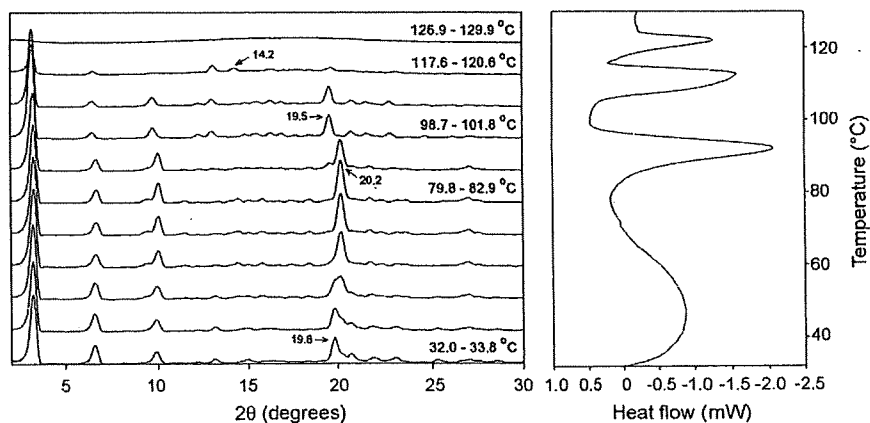


Fig. 6. Relationship between the PXRD patterns and DSC thermogram of the hydrate.