

FT-ラマン分光法を用いた製剤中の主薬結晶多形及び無晶形の簡易定量法

上野高裕,^{*,a} 浦上康司,^a 東 篤也,^a 梅本和一,^a 神戸正幸,^b 北村桂介^c

A Simple Method for Quantitative Determination of Active Drug Polymorphs and Amorphous in Drug Products by Fourier Transform-Raman Spectroscopy

Takahiro UENO,^{*,a} Koji URAKAMI,^a Atsuya HIGASHI,^aKazuichi UMEMOTO,^a Masayuki GODO,^b and Keisuke KITAMURA^c

Analytical Development Laboratories, Takeda Pharmaceutical Company Limited,^a Takeda Analytical Research Laboratories, LTD.,^b 2-17-85 Juso Honmachi, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japan, and Department of Analytical Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University,^c 5 Misasagi-Nakauchicho, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

(Received February 16, 2005; Accepted June 30, 2005)

The feasibility of a simple Fourier transform (FT)-Raman spectroscopic method for the quantitative determination of unexpected active drug polymorphs or amorphous in drug products was explored. In this study, calibration samples were prepared by physically mixing drug substances with their polymorphs or amorphous, without using excipients. A partial least-squares (PLS) method was applied to the quantitative analysis of the FT-Raman spectra obtained. As model drug products, compound A drug substances (form α) containing several ratios of polymorph, (form β), were physically mixed with excipients to prepare powder samples corresponding to compound A tablets (30 and 120 mg). The mixture of compound B, form I and amorphous, were also mixed with excipients to mimic powdered compound B tablets (32 mg). Satisfactory relationships between the theoretical contents of polymorph or amorphous and determined contents were obtained; quantitation limits were 5–10%. In the case of powder samples corresponding to compound A tablets (30 mg) and compound B tablets (32 mg), differentiating the FT-Raman spectra prior to PLS analysis was required to improve the precision of the determinations.

Key words—Fourier transform-Raman spectroscopy; polymorph; amorphous; drug product; quantitative determination

諸 言

医薬品原薬は結晶形の違いによって物理化学的性質が異なり、安定性や bioavailability に影響を及ぼすことはよく知られている。^{1,2)} そのため、医薬品開発の初期段階で原薬の結晶多形を評価することは製薬企業にとって通常業務の 1 つとなっている。³⁾ 多形評価は原薬単独で行うだけでなく、原薬によっては製剤化の工程で結晶転移や非晶質化する可能性もあることから、製剤中の原薬が意図した結晶形を保持していることを確認する必要がある。しかし、製剤中には原薬以外の賦形薬の割合が多いため、原薬の結晶形を測定することは一般的に困難とされている。

現在、医薬品原薬の結晶多形検討に使用されている測定法としては、熱分析法 (DSC),⁴⁾ 粉末 X 線回折法,^{4,9)} 固体 NMR 分光法,^{7,9)} IR 分光法,^{6,9)} 近赤外分光法,^{4,5)} ラマン分光法^{6,8)} などが挙げられる。これら測定法を固形製剤分析へ適用する場合、熱分析法、粉末 X 線回折法、固体 NMR 分光法及び IR 分光法では、製剤中に多量存在する賦形薬の妨害により測定が困難となる。¹⁰⁾ また、近赤外分光法は製剤中の原薬含量の測定には広く利用されているが、¹¹⁾ 賦形薬の妨害を受け易いため結晶多形の検討に適用された報告は少ない。一方、非破壊的な簡易測定が可能であることや賦形薬と原薬のスペクトルが重ならない領域が存在することから、最近ではラマン分光法による製剤中原薬の結晶定量が報告されるようになってきた。^{10,12,13)}

しかし、これまでのラマン分光法による報告では、そのほとんどで検量線の作成は賦形薬に原薬を

^a武田薬品株式会社製薬本部開発分析研究所, ^b株式会社武田分析研究所, ^c京都薬科大学薬品分析化学教室
e-mail: Ueno_Takahiro@takeda.co.jp

添加した混合製剤試料を測定して行い、製剤中の原薬結晶形を定量している。¹²⁾ 製剤開発の初期段階では複数用量の製剤で開発を進めることが多く、製剤の用量毎に混合製剤試料を調製し、検量線を作成しては一連の測定に長時間を要し現実的な測定とは言い難い。そこで本研究では、原薬結晶形及び無晶形を用いて作成した検量線で製剤中原薬の結晶多形及び無晶形定量の可能性について検証を行った。本検討のモデル製剤として、製剤中に物理的に結晶多形及び無晶形を混合させた Compound A 錠 (30 及び 120 mg) 及び Compound B 錠 (32 mg) を用いた。

実 験

1. 試料 Compound A の Form α 及び Form β 並びに Compound B の Form I は武田薬品工業株式会社製薬本部製薬研究所で製造されたものを使用した。Compound B の無晶形は、ステンレス製シリンダーにステンレス製ボール及び Compound B の Form I 約 1 g を入れ、錠剤粉砕機で約 20 分間粉砕後、高出力粉末 X 線で無晶形の確認をしてから使用した。Compound A 錠及び Compound B 錠の賦形薬混合粉末並びに Compound A 錠 (120 mg) 及び Compound B 錠 (32 mg) は、武田薬品工業株式会社製薬本部製剤研究所で製造されたものを使用した。

2. キャリブレーション試料の調製 Compound A の検量線作成 (PLS モデルの構築) には、Form α (開発型結晶) と Form β の混合試料を調製して用いた (Form β : 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100%)。

Compound B の検量線作成 (PLS モデルの構築) には、Form I (開発型結晶) と無晶形の混合試料を調製して用いた (無晶形: 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100%)。

3. モデル製剤の調製 今回の検討では任意の割合で Form β を含有する Compound A 錠及び無晶形を含有する Compound B 錠を打錠調製できなかったため、それぞれ粉末試料を用いた。なお、Form β 及び無晶形を含有しないそれぞれの錠剤と粉末試料を測定した結果、同様の FT-ラマンスペクトルが得られ、打錠形成による影響がないことを確認した (結果及び考察の 1-1. 及び 2-1. 参照)。

Compound A のモデル製剤として、Form α と Form β を任意の割合 (Form β : 0, 5, 10, 20%) で

含む Compound A 錠 (30 及び 120 mg) に相当する粉末試料を調製した。なお、Compound A 錠 (120 mg) は、Compound A 原薬 120 mg に賦形薬 200 mg を混合 (賦形薬の約 50% は乳糖及びトウモロコシデンプン、製剤中の原薬濃度 37.5%) し、Compound A 錠 (30 mg) は、Compound A 原薬 30 mg に賦形薬 290 mg を混合 (賦形薬の約 85% は乳糖及びトウモロコシデンプン、製剤中の原薬濃度 9.4%) したいずれも総質量 330 mg の製剤である。

Compound B のモデル製剤として、Form I と無晶形を任意の割合 (無晶形: 0, 10, 20, 50%) で含む Compound B 錠 (32 mg) に相当する粉末試料を調製した。なお、Compound B 錠 (32 mg) は、Compound B 原薬 32 mg に賦形薬 228 mg を混合 (賦形薬の約 78% は乳糖及びトウモロコシデンプン、製剤中の原薬濃度 12.3%) した総質量 260 mg の製剤である。Figures 1 及び 2 に Compound A 及び Compound B の構造式を示す。

4. 装置及び測定法 FT-ラマン分光装置はサーモエレクトロン株式会社製 NEXUS670 (Raman Module) を用いた。光源は YAG レーザー 1064 nm を使用し、レーザーパワーは約 0.5 W で測定した。分解能は 4 cm^{-1} 、積算回数は 16, 32 又は 128

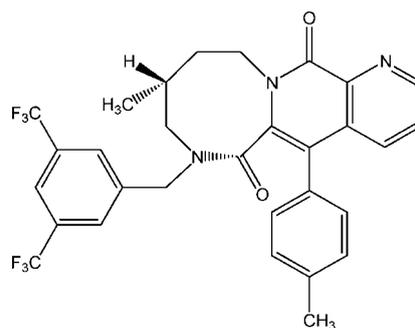


Fig. 1. Chemical Structure of Compound A

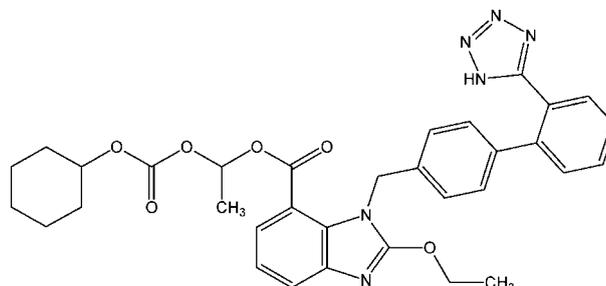


Fig. 2. Chemical Structure of Compound B

回, サンプルゲインは 16, ミラー速度は 0.3165, アパーチャは 100 で行った. ガラス製マイクロチューブ (8φ×50 mm) に 0.5—1 cm の高さになるように粉末試料を入れ (約 100 mg), 測定場所を変えて 6 回繰り返し測定した.

錠剤粉砕機は, SPEX 8000 Mixer/Mill を使用した. 高出力粉末 X 線は, 理学電機株式会社製 RINT Ultima+ 2100 を使用した.

5. スペクトル解析法 スペクトルの解析処理はサーモエレクトロン社製の解析ソフト Omnic (ver.6.2) 及び TQ Analyst (ver.6) で行った. 定量分析は, Omnic ソフト上でキャリブレーション試料を各 6 回測定し, そのスペクトルを Partial least squares (PLS) 回帰分析することにより行った. そのうち Compound A は 5 回のデータで検量線を作成 (PLS モデル構築) し, 1 回のデータで構築した PLS モデルの妥当性を確認した. Compound B は 4 回のデータで検量線を作成 (PLS モデル構築) し, 2 回のデータで構築した PLS モデルの妥当性を確認した. モデル製剤の定量分析は, TQ Analyst で構築した PLS モデルを Omnic ソフト上に設定してスペクトルを解析した.

結果及び考察

1. Compound A 錠中の原薬結晶多形の定量

1-1. FT-ラマンスペクトル Figure 3 に Compound A の Form α 及び β , 賦形薬混合粉末並

びに 30 mg 及び 120 mg 錠相当粉末試料の FT-ラマンスペクトル (1400—1800 cm^{-1}) を示す. Compound A の芳香環, C=C 及び C=N 伸縮振動によるものと推測される 1500—1700 cm^{-1} のバンドは賦形薬の妨害をほとんど受けず, Form α 及び β の間で明確な差が認められた (例えば, 1605 cm^{-1} のバンド). また, 30 mg 及び 120 mg 錠の打錠試料 (Form α のみ含有) を測定した結果, いずれも粉末試料と同様のスペクトルを示し (Fig. 3), 打錠形成による Form α 及び β のスペクトル変化は認められなかった.

1-2. 検量線の作成 Figure 4 に Form α 及び β の混合試料の FT-ラマンスペクトルを示す (1400—1800 cm^{-1}). PLS モデルの構築は, 1589 cm^{-1} のバンドで強度補正後, PLS 回帰分析により 1500—1700 cm^{-1} の範囲のバンドで行った結果, 理論値と計算値との間で良好な直線 ($y=0.996x+0.362$, $r=0.997$) が得られた. さらに, 構築した PLS モデルの妥当性を確認したところ, 一定の傾向は認められず, ほぼ得られた検量線を通る良好な結果であった (Fig. 5). 本結果から, Form α 及び β の FT-ラマンスペクトルの絶対強度は, 1589 cm^{-1} のバンドで補正を行えば同じ強度になることが判明した.

1-3. Compound A 錠 (120 mg) モデル製剤の測定 Form α 及び Form β を種々の割合で含有する 120 mg 錠相当粉末試料について FT-ラマン測定を行い, 得られたスペクトルを 1-2. で構築した

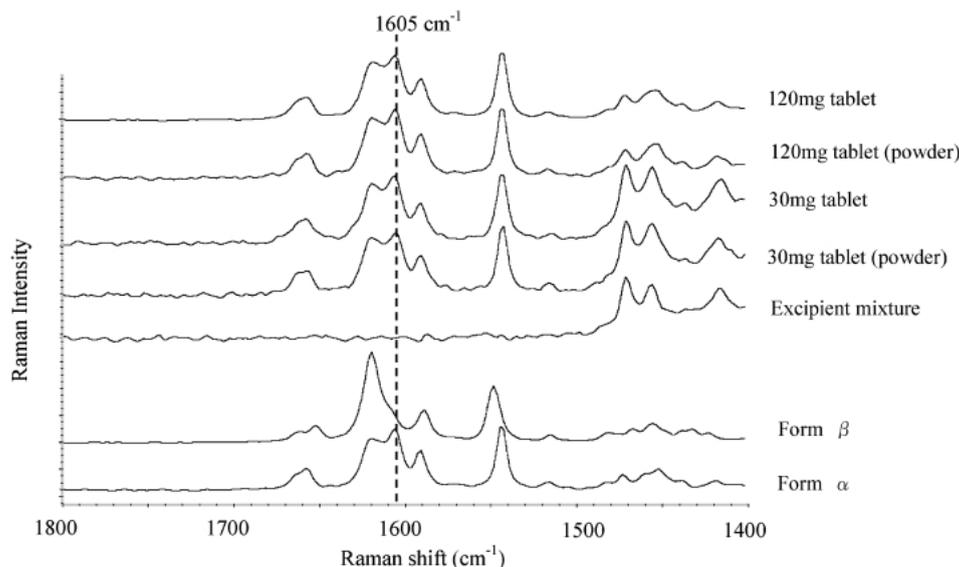
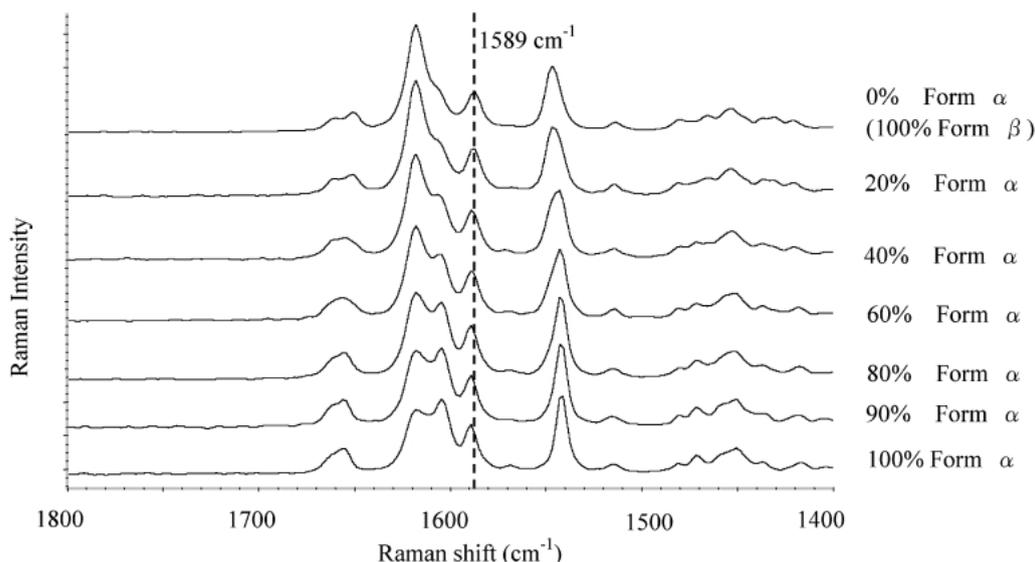
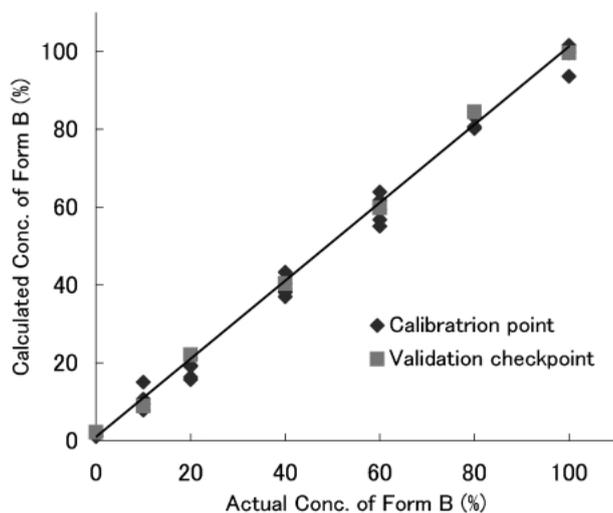


Fig. 3. FT-Raman Spectra of Form α , Form β and Various Drug Products of Compound A

Fig. 4. FT-Raman Spectra of Form α of Compound AFig. 5. Calibration Curve for Mixtures of Form α and β of Compound A Using FT-Raman Spectra: PLS Model

PLS モデルを用いて定量解析を行った。6 回繰り返し測定した個々の値には理論値 $\pm 5\%$ の範囲外の値も認められたが、それらの平均値はすべて理論値 $\pm 5\%$ の範囲内であった (Table 1)。

1-4. Compound A 錠 (30 mg) のモデル製剤の

測定 120 mg 錠相当粉末試料と同様に、30 mg 錠相当粉末試料についても検討した結果、6 回の平均値でも理論値 $\pm 5\%$ から外れる結果が得られた (Table 2)。その原因としては、原薬量が減少したため Fig. 3 に示した 1605 cm^{-1} 付近の重複したバンドなどの識別性が困難になったためと考えられ

Table 1. Results of FT-Raman Analysis of Compound A Tablets (120 mg)

Act. %	Calc. %						Mean	S.D.
	1	2	3	4	5	6		
0	1.9	1.7	0.4	0.0	-2.4	0.4	0.3	1.5
5	4.9	4.5	5.9	3.0	7.4	4.1	5.0	1.5
10	10.6	9.9	7.2	7.8	9.1	16.4	10.2	3.3
15	12.3	13.0	10.9	12.3	6.8	14.7	11.7	2.7
20	20.0	24.1	18.3	15.2	16.6	26.4	20.1	4.4

■ : within 5% value of Act. %.

Table 2. Results of FT-Raman Analysis of Compound A Tablets (30 mg)

Act. %	Calc. %						Mean	S.D.
	1	2	3	4	5	6		
0	-3.9	0.2	-2.2	-1.3	2.1	0.1	-0.8	2.1
5	6.7	4.4	-0.9	4.1	3.5	6.2	4.0	2.7
10	3.7	5.0	2.5	-2.8	3.4	8.9	3.4	3.8
15	9.7	13.1	4.9	12.3	7.4	5.1	8.8	3.5
20	18.3	21.8	13.8	21.0	10.3	16.1	16.9	4.4

■ : within 5% value of Act. %.

た。そこで、重複したバンドを明確に分離して定量するため、Form α 及び β のラマンスペクトルの微分を試みた。Figure 6 に示すように Form α と β のスペクトルでは二次微分することによって明確なバンドの分離が認められた。次に二次微分したスペクトルから PLS モデルを構築するために Form α 及

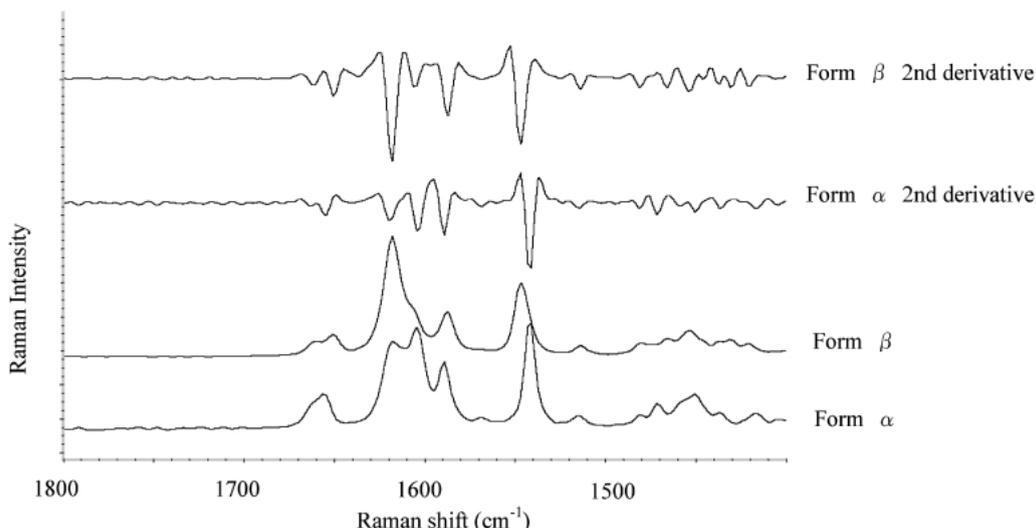


Fig. 6. FT-Raman Spectra of Form α and β of Compound A and Their 2nd Derivative

び β の混合試料のスペクトルを二次微分した。それらスペクトルを PLS 回帰分析して検量線を作成した結果、理論値と計算値との間で良好な直線 ($y = 0.989x + 0.467, r = 0.995$) が得られ、構築した PLS モデルの妥当性を確認したところ、一定の傾向は認められず、ほぼ得られた検量線上を通る良好な結果であった (Fig. 7)。その二次微分した場合の PLS モデルを用いて、30 mg 錠相当粉末試料のラマンスペクトルを二次微分して再解析した。6 回繰り返し測定した個々の値は理論値 $\pm 5\%$ の範囲外の値も認められたが、それらの平均値はすべて理論値 $\pm 5\%$ の範囲内であり、微分しない場合と比較して定量性の向上が認められた (Table 3)。平均値はすべて理論値 $\pm 5\%$ の範囲内であったが、個々の測定ばらつきから、本条件下での Form β の定量限界を 10% と設定した。一方、Pratiwi¹³⁾ らは、150 mg を含有している高用量製剤ではあるが、ラマン分光法を用いて検出限界及び定量限界を 0.6% 及び 1.8% と報告している。しかし、この報告における検量線作成は原薬結晶形から作成した検量線ではなく、製剤に種々の割合の結晶原薬を添加して作成したものであり、複数用量製剤が存在する場合には製剤の用量毎に別々の検量線作成が必要となる欠点を有する。

2. Compound B 錠中の原薬結晶形の定量

2-1. FT-ラマンスペクトル Figure 8 に Compound B の Form I 及び無晶形、賦形薬混合粉末並びに 32 mg 錠相当粉末試料の FT-ラマンスペ

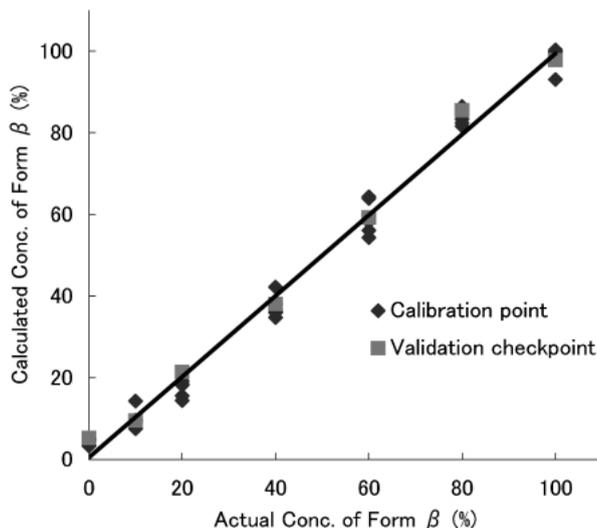


Fig. 7. Calibration Curve for Mixtures of Form α and β of Compound A Using 2nd Derivative FT-Raman Spectra: PLS Model

Table 3. 2nd Derivative Results of FT-Raman

Act. %	Calc. %						Mean	S.D.
	1	2	3	4	5	6		
0	-6.6	7.3	-0.4	3.8	5.7	5.9	2.6	5.2
5	9.5	-1.8	7.9	8.8	0.1	9.0	5.6	5.0
10	2.5	11.0	10.5	14.1	16.7	13.2	11.3	4.9
15	18.3	17.3	9.8	20.9	10.9	15.1	15.4	4.3
20	22.1	24.4	18.8	25.1	16.4	22.7	21.6	3.4

■ : within 5% value of Act. %.

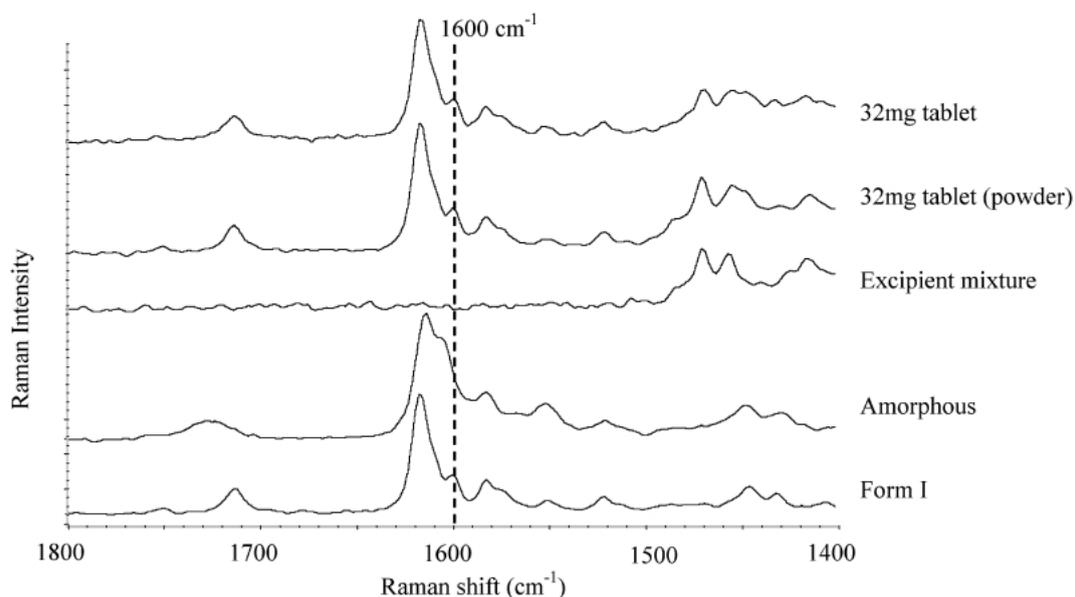


Fig. 8. FT-Raman Spectra of Form I, Amorphous and Various Drug Products of Compound B

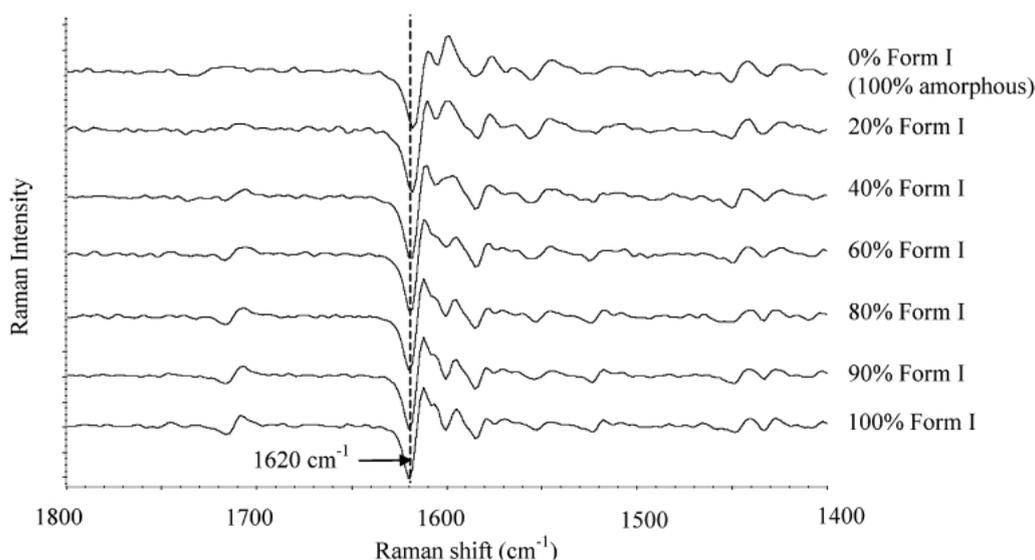


Fig. 9. 1st Derivative FT-Raman Spectra of Form I and Amorphous of Compound B and Their Binary Mixtures

クトル ($1400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$) を示す。芳香環, $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{N}$ 及び $\text{N}=\text{N}$ 伸縮振動によるものと推測される $1500\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ のバンドは賦形薬の妨害をほとんど受けず, 1600 cm^{-1} 付近のバンドで Form I 及び無晶形の識別は可能であった。しかし, Compound B の Form I と無晶形の識別性は Compound A の場合ほど明確なものではなかった。また, 32 mg 錠の打錠試料 (Form I のみ含有) を測定した結果, 粉末試料と同様のスペクトルであり (Fig. 8), 打錠形成によるスペクトル変化は認めら

れなかった。

2-2. 検量線の作成 Figure 9 に Form I 及び無晶形の混合試料を一次微分した FT-ラマンスペクトルを示す ($1400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$)。Compound B の場合は明確なバンドの差が認められなかったので一次微分を行った。PLS モデルの構築は, 1620 cm^{-1} のバンドで強度補正後, PLS 回帰分析により $1500\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ の範囲のバンドを用いて行った結果, 理論値と計算値の間で良好な直線 ($y=1.000x+0.007$, $r=0.999$) が得られた。さらに構築した

PLS モデルの妥当性を確認したところ、一定の傾向は認められず、ほぼ得られた検量線を通る良好な結果であった (Fig. 10). 本結果から Form I 及び無晶形の FT-ラマンスペクトルの絶対強度は、 1620 cm^{-1} のバンドで補正を行えば同じ強度になることが判明した。

2-3. Compound B 錠 (32 mg) モデル製剤の測定
Form I 及び無晶形を種々の割合で含有する 32 mg 錠相当粉末試料について FT-ラマン測定を行い、一次微分したスペクトルを 2-2. で構築した一次微分の PLS モデルを用いて定量解析を行った (Table 4). 6 回繰り返し測定した個々の値は理論値 $\pm 5\%$ の範囲外の値も認められたが、それらの平均値はすべて理論値 $\pm 5\%$ の範囲であった (Table 4). 平均値はすべて理論値 $\pm 5\%$ 以内の範囲であったが、個々の測定ばらつきから本条件下での無晶形の定量限界を 10% と設定した。

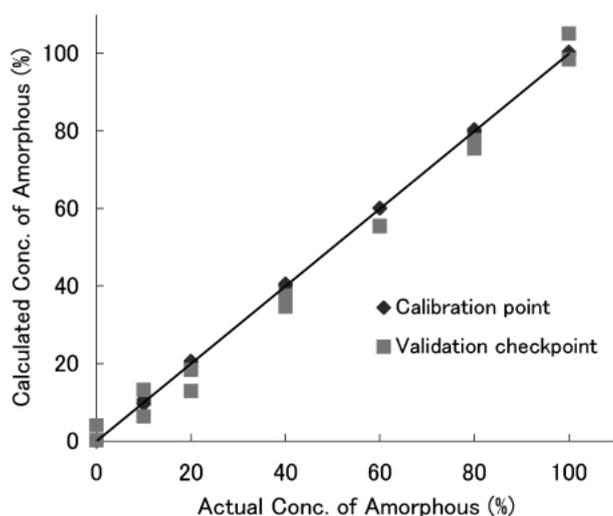


Fig. 10. Calibration Curve for Mixtures of Form I and Amorphous of Compound B Using 1st Derivative FT-Raman Spectra: PLS Model

Table 4. 1st Derivative Results of FT-Raman Analysis of Compound B Drug Products (32 mg)

Calc. %	1	2	3	4	5	6	Mean	S.D.
0	6.4	8.7	3.8	8.5	-2.6	3.2	4.7	4.2
10	7.9	12.6	9.1	9.9	5.7	13.8	9.8	3.0
20	24.1	27.7	16.5	22.5	15.3	17.8	20.7	4.9
50	55.9	56.0	48.7	41.7	57.6	41.5	50.2	7.4

■ : within 5% value of Calc. %.

結 論

製剤中の原薬結晶多形及び無晶形の定量法について、FT-ラマンスペクトルに PLS 回帰分析を適用して検討した。FT-ラマン分光法では、芳香環などの二重結合を高感度に観測できること及び賦形薬中に二重結合を有する化合物が含まれていないことから、本検討では製剤中原薬の定量分析を $1500\text{—}1800\text{ cm}^{-1}$ の範囲で行った。また、試料調製などの作業の簡便性を考え、原薬のみから作成した検量線を用いて製剤中原薬の結晶多形及び無晶形定量の可能性を検証した。その結果、結晶多形間でスペクトルに明確な差のある Compound A の高用量製剤 (120 mg 錠) では、スペクトルに微分などの処理をすることなく、直接原薬の FT-ラマンスペクトルから構築した PLS モデルにより定量が可能であった。また、スペクトル強度が弱く重複しているバンドがある場合 [Compound A 錠 (30 mg) 及び Compound B 錠 (32 mg)] は、FT-ラマンスペクトルを微分することにより重複したバンドを明確に分離して定量性を向上させることが可能であった。今回使用した FT-ラマン分光装置は錠剤の状態でも測定することも可能であり、測定に要する時間も通常わずか 1—5 分程度である。本法を用いれば、処方検討を含む製剤開発の初期段階で製剤中の原薬結晶形及び無晶形の定量を迅速簡便に測定することが可能であり、Process Analytical Technology (PAT) が注目されていることから今後の発展が期待される。

REFERENCES

- 1) Byrn S., "Solid-State Chemistry of Drugs," Academic Press, New York, 1982.
- 2) Ford J., *Pharm. Acta Helv.*, **3**, 69–88 (1986).
- 3) International Conference on Harmonization (ICH), Q6(A).
- 4) Seyer J. J., Luner P. E., Kemper M. S., *J. Pharm. Sci.*, **89**, 1305–1316 (2000).
- 5) Buckton G. J., Yonemochi E., Hammond J., Moffat A., *Int. J. Pharm.*, **168**, 231–241 (1998).
- 6) Gu X. J., Jiang W., *J. Pharm. Sci.*, **84**, 1438–1441 (1995).
- 7) Vickery R. D., Nemeth G. A., Maurin M. B.,

- J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 125–129 (2002).
- 8) van Hoof P., Lammers R., Puijenbroek R. v., v/d Schans M., Carlier P., Kellenbach E., *Int. J. Pharm.*, **238**, 215–228 (2002).
- 9) Helmy R., Zhou G. X., YChen Y. W., Crocker L., Wang T., Wenslow Jr. R. M., Vailaya A., *Anal. Chem.*, **75**, 605–611 (2003).
- 10) Auer M. E., Griesser U. J., Sawatzki J., *J. Mol. Struct.*, **661–662**, 307–317 (2003).
- 11) Eustaquio A., Blanco M., Jee R. D., Moffat A. C., *Anal. Chim. Acta*, **383**, 283–290 (1999).
- 12) Szostak R., Mazurek S., *Analyst*, **127**, 144–148 (2002).
- 13) Pratiwi D., Fawcett J. P., Gordon K. C., Rades T., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **54**, 337–341 (2002).