

令和2年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告

日本薬局方医薬品の各条試験及び製造工程試験への適用を目指した遠赤外／テラヘルツ分光法の標準化に関する研究

— 遠赤外／テラヘルツスペクトルを用いた市販医薬品（錠剤）の識別性評価（第3報）*⁴—坂本 知昭*^{1,*2,#}, 志村 啓*³, 愛甲 健二*³, 茂原 瑞希*³

Study on Standardization of Far-infrared / Terahertz (THz) Spectroscopy for Application as an Identification Test of Japanese Pharmacopoeia Pharmaceuticals

— Spectral Distinguishability among Commercial Pharmaceuticals (Tablets) Using Far-infrared / THz Spectroscopy III *⁴ —Tomoaki SAKAMOTO *^{1,*2,#}, Kei SHIMURA *³, Kenji AIKO *³ and Mizuki MOHARA *³

Summary

In order to evaluate the applicability of terahertz spectroscopy to the Japanese Pharmacopoeia (JP) identification test, the distinctiveness of the terahertz (THz) spectra among four Japanese Pharmacopoeia levofloxacin (LVFX) tablets was examined. As a result, although it is stated in the package insert that LVFX hemihydrate is used, a commercially available formulation was found to contain a mixture of hemihydrate and monohydrate by THz spectral analysis. An analysis of the dehydration process of LVFX hemihydrate and monohydrate in a dry environment and comparison with the dehydration process of tablets having similar components suggested that polymorphic conversion from hemihydrate to monohydrate had occurred in LVFX tablets D during the manufacturing or storage process. The coexistence of monohydrate may promote dehydration under a drying environment in general THz spectral measurements. Our findings suggest that THz spectroscopy, which can sensitively detect pseudo-polymorphism, would be applicable for use not only as a JP identification test, but also to check substandard drugs on the market.

Keywords

Terahertz spectroscopy, Qualitative analysis, Levofloxacin, Pseudo-polymorphs, Dehydration

* 1 国立医薬品食品衛生研究所薬品部 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26 (〒210-9501)

National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki City, Kanagawa 210-9501, Japan

* 2 静岡大学電子工学研究所 静岡県浜松市中区城北3-5-1 (〒432-8011)

Shizuoka University Research Institute of Electronics, 3-5-1 Johoku, Naka-ku, Hamamatsu, Shizuoka 432-8011, Japan

* 3 株式会社日立ハイテク 茨城県ひたちなか市新光町552-53 (〒312-8504)

Hitachi High-Tech Corporation, 552-53 Shinkocho, Hitachinaka-shi, Ibaraki 312-8504, Japan

* 4 本研究は一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団の令和2年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」事業により行ったものである

責任著者 Corresponding author

1 緒言

日本薬局方に収載される医薬品は、医薬品各条の規格に適合することが品質基準として要求されている。しかしながら、原薬などの製剤原料の起原の違い、また製造工程の違いにより、医薬品各条の規格試験で見出すことが困難な品質因子や物性へ影響を与える因子が存在することもあるため、日本薬局方収載医薬品の品質特性に関する情報をより多く収集し、評価することが望ましい。そこで、日本薬局方への収載が期待されている分析法の一つである遠赤外（／テラヘルツ）分光法を用いて、日本薬局方収載医薬品の品質特性解析法及び品質評価法としての可能性を検討した。テラヘルツ（遠赤外）領域の電磁波（0.1 THz～10 THz、約 3 cm^{-1} ～約 333 cm^{-1} ）は、医薬品を構成するほとんどの有機化合物に対して高い透過性を示し、主に分子の骨格振動、分子内振動、分子間振動あるいは結晶格子（フォノン）振動を検出すると理解されている。この中でファンデルワールス結合などの静電的な弱い相互作用は、水素結合より低い波数（周波数）領域に観察されるとされている。テラヘルツ（遠赤外）分光法では、一般に中赤外、近赤外分光法並びにラマン分光法（基準振動を対象）で得られるような、官能基などの分子の化学構造に結びつく情報を得ることは難しい。現在までに、フォノン振動を含む振動モード解析（帰属）が量子化学計算などに基づき進められており、いくつかの化合物において分子間相互作用やフォノン振動に関する帰属結果が示されている。しかしながら、これらのフォノン振動モードの解析結果を、製薬分野においてどのように活用したらよいのかという点については、まだ多くの検討の余地が残されている。

低波数領域では、主に、分子全体にまたがって運動するような振動モードの吸収、分子内及び分子間振動、フォノン振動などを検出できるが、スペクトルチャートに観察されるピークがどのような振動に由来するのか特定（帰属）することは容易ではない。しかしながら、医薬品やアミノ酸・糖などの有機分子は骨格振動や分子間振動がTHz周波数帯域に存在しているので、この帯域の分光スペクトルにはそれぞれの分子や結晶構造に固有な吸収が観測できる¹⁾。

テラヘルツ（遠赤外）領域の電磁波の特性として、ある種のプラスチックや医薬品に用いられるほとんどの有機化合物などの多くの材料に対して半透過的であることが挙げられる。このため、医薬品、化学工業分野における製造工程管理ツールとして非破壊測定への適用が期待されている。ただし、医薬品の錠剤を非破壊的に透過測定する場合には、分析種にもよるが、概ね1.5 THzより低周波数側でテラヘルツ波は錠剤を透過する傾向を示す。

昨年度の本研究において、著者らは日本薬局方収載医薬品であるレボフロキサシン（有効成分LVFX.1/2水和物）錠について、市販製剤間の識別性を評価するとともに、エナンチオマーであるLVFXとラセミ体であるOFXNの結晶構造の違いに着目し、遠赤外／テラヘルツ分光法を用いた定性試験における四つ目の技術的要件候補として考えている、①有効成分の特性吸収を検出する、②製剤に含まれる主要な添加剤の特性吸収を検出する、③主成分（PCA）分析及びクラスター解析による相似性の評価、④結晶性なども含めた分子特有のスペクトルパターンが検出できることを検討し、その識別性評価を示すとともに、あるメーカーのレボフロキサシン錠に有効成分であるLVFX.1/2水和物のほか、擬似結晶多形であるLVFX.1水和物が混在する錠剤がある可能性が高いことを明らかとした²⁾。今年度は、錠剤中のLVFXの擬似結晶多形についてテラヘルツスペクトルによる解析を継続して行うとともに、擬似結晶多形の混在する原因の究明を試みることを目的として研究を行った。

2 実験方法

2.1 装置、測定条件、試料の前処理及びスペクトル解析

本研究では（株）日立ハイテク（ひたちなか市）にて開発した試作品THz分光器を用いて測定を行った。本装置の外観及び光学系をFig. 1に示す。テラヘルツ光源にはis-TPG³⁾を用い、CMOSカメラにて試料を透過したテラヘルツ光を検出した。周波数測定範囲は0.8～2.5 THz（27～83 cm^{-1} ）、ダイナミックレンジは2 THzにて70～100 dB、周波数分解能は0.01 THz（10 GHz）に設定した。各試料の純物質のテラヘルツ計測は、各試料の質量の約25%

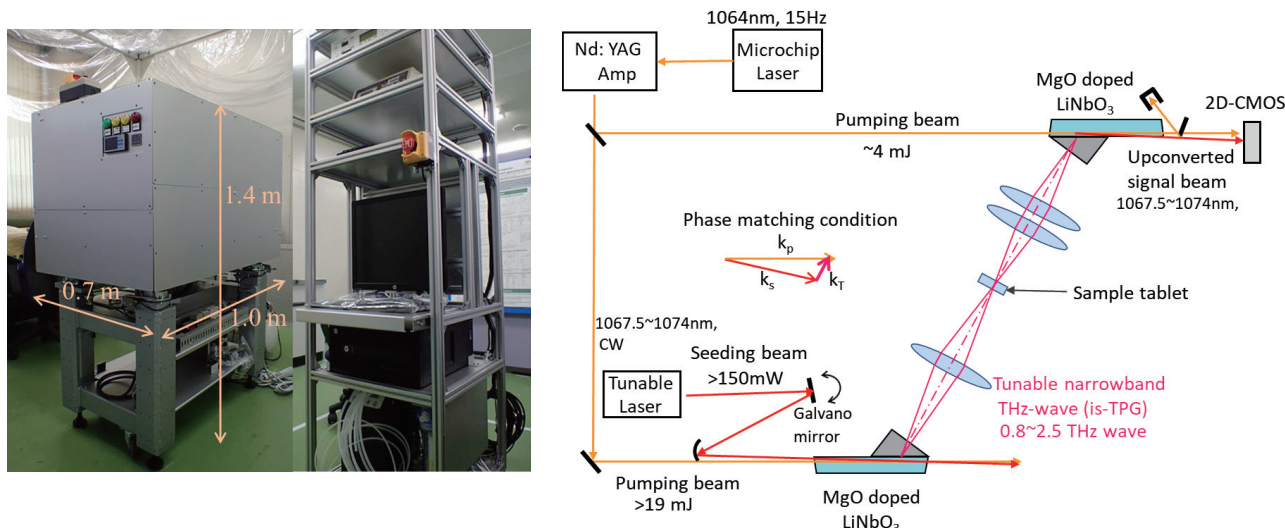


Fig. 1 研究に用いた試作THz分光器とその光学系

相当のポリエチレンを加えて錠剤を作成し、透過測定を行った。また、水和水の安定性を評価するために、相対湿度2%以下の環境で測定を行った。錠剤は厚さ1.6mmに切削し、切削面を0.5mm間隔で3か所測定し、各測定点における周波数平均値を用いて周波数-透過光減衰値曲線（スペクトル）を作成した。スペクトルの微分処理、主成分分析及びスコア分散は、ソフトウェアUnscrambler X Ver.10.5（Camo Japan社製）を用いて行った。

2.2 材料

レボフロキサシン1/2水和物（純度98.0w/w%以上）は富士フィルム和光純薬製（東京）を購入した。レボフロキサシン1水和物は北岡らの論文⁴⁾を参考としてレボフロキサシン1/2水和物に水を加えて調製した。それぞれの化合物はX線回折及び熱分析により、それぞれの擬似結晶多形であることを確認した。

レボフロキサシン製剤は、クラビット錠250mg（第一三共株式会社）、レボフロキサシン錠250mg（日本ジェネリック・長生堂製薬株式会社）、レボフロキサシン錠250mg（コアイセイ株式会社）、レボフロキサシン錠250mg（岩城製薬株式会社）について、市場流通品を購入した。

2.3 X線回折の測定

X線回折はリガク社製の微小部X線回折装置Smart Labを用いて行った。測定波長は0.15418nm

（CuK α ），X線出力は45kV-200mA，走査軸は $2\theta/\theta$ 運動，操作範囲は $1.5 \leq 2\theta \leq 60 \text{ deg}$ ，分光器は多層膜ミラー，ビーム径は $500 \mu\text{m} \phi$ ，走査速度は 1.0 deg/min ，検出器は2次元半導体検出器，サンプリングは 0.01 deg に設定した。1試料につき5点測定（測定間隔1mm）し，平均値を算出した。

2.4 熱分析

熱分析はメトラー・トレド製TG-SDTA851 $^{\circ}$ 型を用いて行った。測定条件は，温度範囲は室温～ 1200°C ，昇温速度は 10°C/min に設定した。雰囲気は乾燥空気で流量は 80 mL/min ，測定容器はプラチナパン（ $70 \mu\text{L}$ ）を用いた。約5mgの試料を測定に供した。

3 実験結果及び考察

3.1 レボフロキサシン1/2水和物と1水和物のテラヘルツスペクトルの比較

レボフロキサシン1/2水和物（LVFX hemihydrate）及び1水和物（LVFX monohydrate）の純物質から得たテラヘルツ原スペクトルをFig. 2に，またそれらの2次微分スペクトルをFig. 3にそれぞれ示す。1/2水和物の特性吸収が 0.93 THz （約 31.0 cm^{-1} ）， 1.35 THz （約 45.0 cm^{-1} ），及び 1.50 THz （約 50.0 cm^{-1} ）付近に，また，1水和物の特性吸収が 1.15 THz （約 38.3 cm^{-1} ）， 1.35 THz （約 45.0 cm^{-1} ）及び 1.60 THz

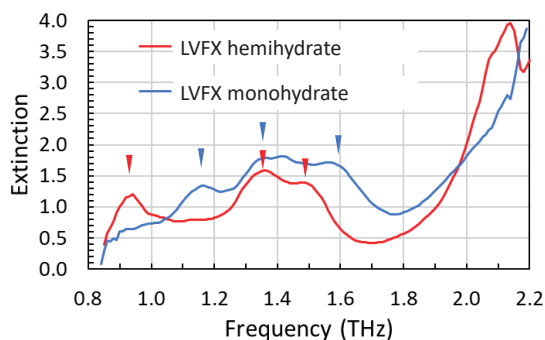


Fig. 2 レボフロキサシン 1/2 (赤線) 及びレボフロキサシン 1 水和物 (青線) から得た THz 原スペクトル

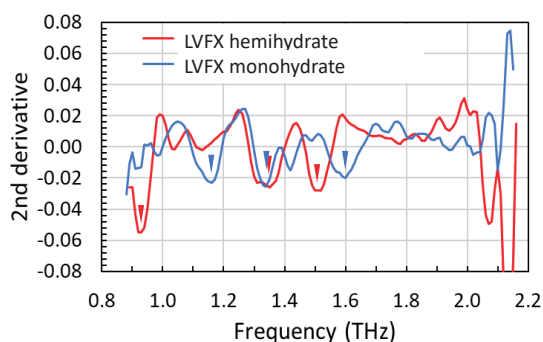


Fig. 3 レボフロキサシン 1/2 (赤線) 及びレボフロキサシン 1 水和物 (青線) から得た THz 二次微分スペクトル

(約 53.3 cm^{-1}) に観察された。

3.2 製剤中のレボフロキサシンの擬似結晶多形

昨年度の研究成果として、あるメーカーより供給されている市販LVFX錠Dで他の3市販製剤と異なるテラヘルツスペクトルが見出されたことを報告した^{2,5)}。このスペクトルパターンの違いについて、錠剤中のLVFXの含有率（無水物換算で約75%）から錠剤から観察される吸収はほぼLVFX由来である可能性が高いこと、また処方成分がLVFX錠Aとほぼ同じであり、かつLVFX錠AとB及びCの処方成分が異なるにもかかわらず同じスペクトルパターンを示すことなどから、得られたスペクトルの違いは含有するLVFX由来のテラヘルツ吸収が変化しているものと推察した（Table 1）。

これらの推察については、LVFX錠A及びDの粉末X線回折（XRD）を行い、それぞれのX線回折標準データライブラリーと比較すること、また熱分析（TG-DTA）を行い、加熱による質量減少（TG curve）、質量変化率（質量減少の微分）及び吸発熱反応（DTA curve）データを求めることにより、LVFX錠Dに含まれるLVFXが1/2水和物及び1水和物が混在していることを確認した。

3.3 レボフロキサシン 1/2 水和物と 1 水和物における水和水の安定性

相対湿度2%以下、露点 -30°C 以下で測定したLVFX 1/2水和物及び1水和物のテラヘルツスペク

Table 1 研究に用いた市販製剤の処方成分

No.	成分添加剤	LVFX錠A	LVFX錠B	LVFX錠C	LVFX錠D
1	結晶セルロース	○	○	○	○
2	カルメロース	○	○	○	○
3	ヒドロキシプロピルセルロース (HPC)	○	○	○	○
4	フマル酸ステアリルナトリウム	○	○		○
5	ヒプロメロース (HPMC)	○	○	○	○
6	酸化チタン	○	○	○	○
7	タルク	○	○	○	○
8	マクロゴール6000 or マクロゴール	○	○	○	○
9	黄色三酸化鉄	○	○	○	○
10	カルナウバロウ	○		○	○
11	二酸化ケイ素			含水○	
12	ステアリン酸マグネシウム			○	

トルの1.35 THzにおける透過光減衰率の経時変化をFig. 4に示す。なお、透過光減衰率は、乾燥開始直後の透過光減衰値を100%として算出した。透過光減衰値はLVFX水和物の量的な意味合いを持ち、透過光減衰値の減少はLVFX水和物がもつ結晶構造中の水和水が脱離し、結晶構造が変化することを示している。LVFX 1/2水和物では、乾燥環境下に試料を静置後、1.2~1.7 THzの範囲の吸収が5、10時間後で経時的に小さくなり、15時間後にはほぼ消失した。1.35 THzにおける透過光減衰値は乾燥直後と比べて、5時間後に約74%、10時間後に約51%にそれぞれ減少した (Fig. 5)。一方、1水和物では、同様に経時的に透過光減衰値の強度は減少するものの、5時間後に約63%、10時間後に約18%にそれぞれ

減少した。両化合物共に脱水はほぼ線形的に進行することがわかった。

3.4 レボフロキサシン錠における水和水の安定性

相対湿度2%以下、露点-30℃以下で測定したLVFX錠A及びDのテラヘルツスペクトルの1.35 THzにおける透過光減衰率の経時変化をFig. 6に示す。LVFX錠Aでは、乾燥開始後、直線的に透過光減衰率が低下、すなわち脱水が進行し、1.35 THzにおける透過光減衰値は2時間後に約90%、4時間後に約75%、10時間後に約35%、そして14時間後には約3%に減少した。また16時間後には透過光減衰値は消失したことが確認された。一方、LVFX錠Dでは、乾燥

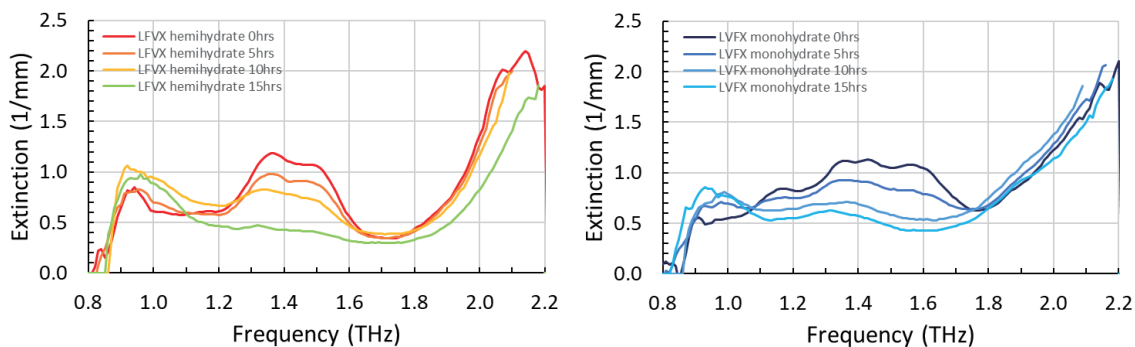


Fig. 4 LVFX 1/2水和物及び1水和物のテラヘルツスペクトルの経時変化

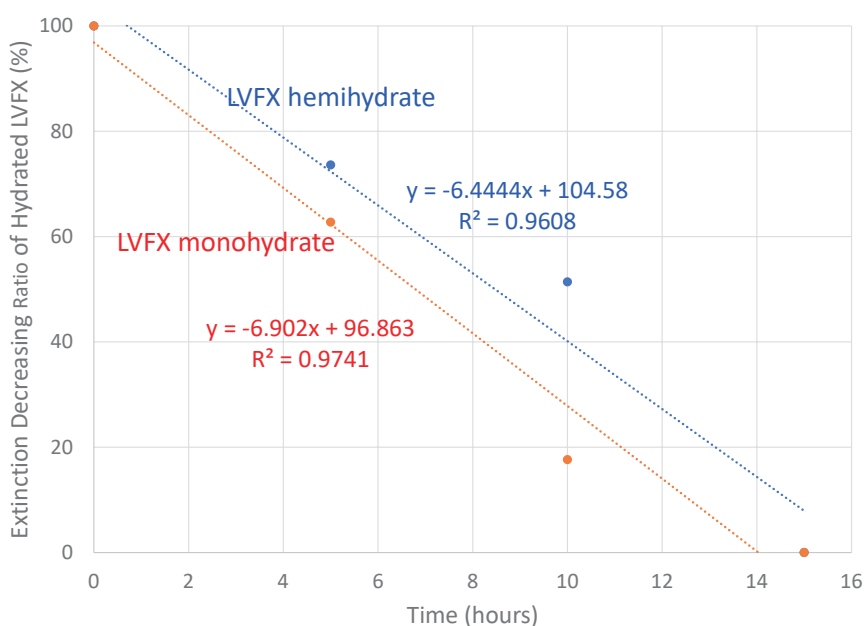


Fig. 5 LVFX 1/2水和物及びLVFX 1水和物の透過光減衰率の経時変化

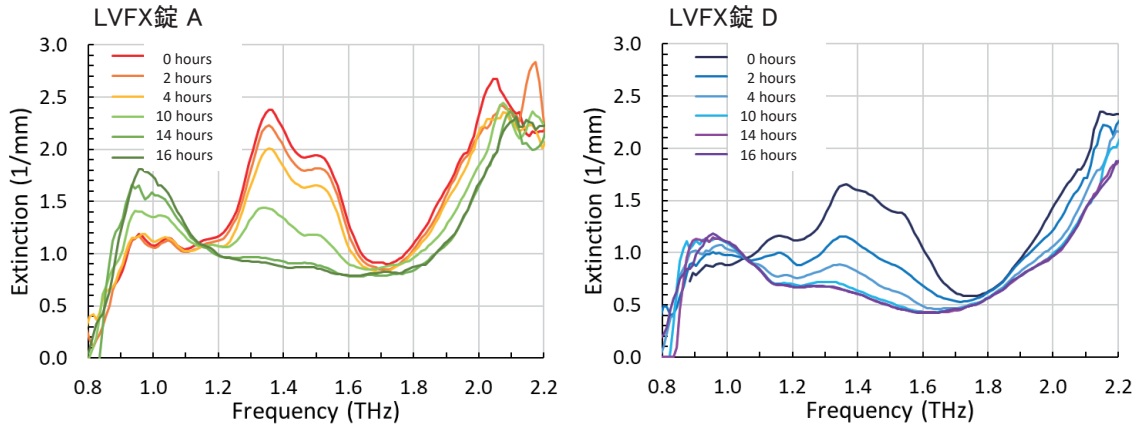


Fig. 6 LVFX 錠A及びDのテラヘルツスペクトルの経時変化

開始後2時間で1.35 THzにおける透過光減衰値は約51%に減少し、4時間後に約25%、10時間後に約6%に減少した。14時間以降で透過光減衰値は確認されなかった。1/2水和物と1水和物が混在していることが確認されたLVFX錠Dでは、脱水が非線形的に進行することが明らかとなった (Fig. 7)。

LVFX錠Aにおける1.35 THzにおける透過光減衰率の経時変化は、1/2水和物における経時変化とほぼ同じ（一次式の傾きが1/2水和物で-6.44に対して1水和物で-6.61）であり、LVFX錠Aに含まれるLVFXは1/2水和物であることに矛盾しない結果を得た。しかし、LVFX錠Dでは乾燥開始後に4時間までに急速に透過光減衰率が減少し、その後は緩や

かに減少して14時間後には透過光減衰値はほぼ消失し、水和水を含むLVFXはなくなり、完全な脱水物へ転移したことが示唆される結果を得た。LVFX錠Dにおける水和水の経時的な脱水の挙動は1/2水和物並びに1水和物の何れとも一致せず、可変的な脱水の進行が起こったことが明らかとなった。以上の結果から、LVFX錠DのTHz透過スペクトルで観察された、他3錠剤から得られた波形の違いは (Fig. 8)、脱水の進行により水和水が脱離したことが原因である可能性が高いことが示された。これは、LVFX錠Dが製造工程中あるいは製造後に錠剤中のLVFX 1/2水和物の一部が吸湿等により1水和物に転移し、その後、何らかの原因で水和水が

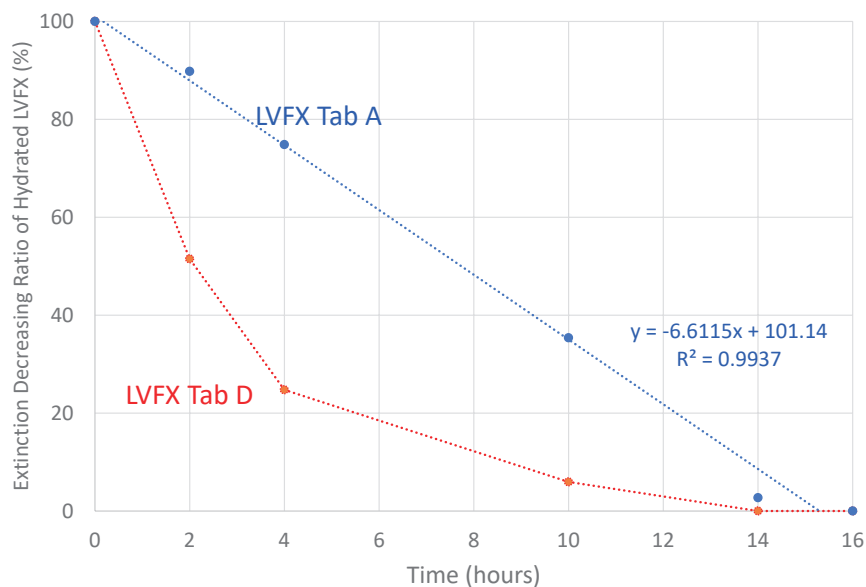


Fig. 7 LVFX 錠A及びDの透過光減衰率の経時変化

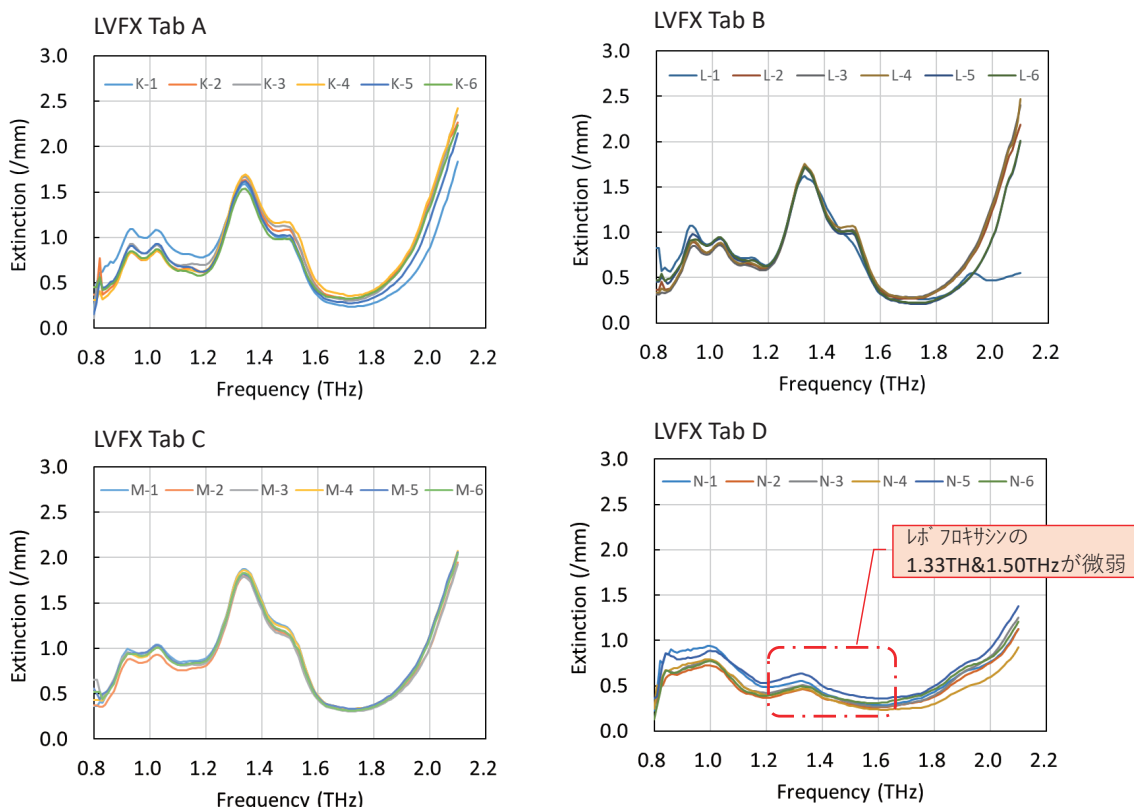


Fig. 8 4種類のLVFX錠から得たTHzスペクトル

脱離した結果として脱水物のTHzスペクトルが得られたものと推察している。THzスペクトルは雰囲気中の水蒸気の影響を受けるため、通例、乾燥空气中で試料室をパージして測定を行う。このことから脱水が進んだことも考えられるが、他の錠剤では1/2水和物のスペクトルが明確に得られていた。各標準物質を用いた検討では、1水和物の方が1/2水和物よりやや脱水が早く進行する傾向を示したが、両擬似結晶多形が混在する製剤における乾燥後の著しい脱水の進行を支持するほどの違いがあると結論付けることは難しいと考えられた。この現象の解明には更なる検討が必要であるが、二つの擬似結晶多形の混在により脱水の進行が著しく促進された可能性があることが示された。LVFX錠AとDにおける溶出性の違いについては、現在、検討中である。

4 結論

結晶格子（フォノン）振動を検出するテラヘルツ分光法を用いて高感度にLVFX錠剤中のLVFXの擬似結晶多形について識別可能であることを示し

た。特に雰囲気により擬似結晶多形転移が起こる可能性の高い製剤においては、製造工程あるいは製造後の保管状態によって、有効成分の擬似結晶形転移が発生することがあり、その結果、放出性や溶出性にも影響を及ぼす可能性があるために品質上の問題が発生する懸念を生じる。このような医薬品における品質評価において、テラヘルツ分光法が有用であることを示すことができた。

これらのことから、例えば市場流通する錠剤を用いた場合でも、有効成分として含有されるLVFX 1/2水和物のTHzスペクトルとの相似性を評価することで、不良医薬品識別への応用も可能であることが示唆された。

文献

- 1) Zeitler, J.A.; Taday,P.F.; Newnham,D.A.; Pepper,M.; Gordon, K.C.; Ride, T. Terahertz pulsed spectroscopy and imaging in the pharmaceutical setting –a review. *J.Pharm.Pharmacol.* 2007, **59**, p.209-223.
- 2) 坂本知昭, 志村啓, 愛甲健二, 茂原瑞希. 令和元年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告 日本薬局方医薬品の確認試験への適用を目指した遠赤外／テラ

- ヘルツ分光法の標準化に関する研究：遠赤外／テラヘルツスペクトルを用いた市販医薬品（錠剤）の識別性評価（第2報）. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2021, 52 (6), p.487-495.
- 3) Mohara, M.; Shimura, K.; Aiko, K.; Kawase, K. Terahertz spectroscopy using an injection-seeded terahertz parametric generator for quantitative analysis and inspection of over-the-counter medicine tablets. *Proc. SPIE*. 2018, 10531, 1053121 <https://doi.org/10.1117/12.2288029>.
- 4) Kitaoka, H.; Wada, C.; Moroi, R.; Hakusui, H. Effect of dehydration on the formation of levofloxacin pseudopolymorphs, *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43 (4), p.649-653.
- 5) Shimura, K.; Mohara, M.; Aiko, K.; Sakamoto, T.; Ono, T. Discrimination of pharmaceutical Tablets based on the analysis of solid-state structure of ingredients using terahertz transmission spectroscopy with the injection seeded parametric generation technique, *ACS Omega*. 2021, 6 (40), p.26707-26714.