

博士論文

医薬品原薬エチドロン酸二ナトリウム
の物性評価

2024年9月

住友ファーマ株式会社
技術研究本部 分析研究所
伊藤直也

略語表

本論文では以下の略語を用いた。

DSC	Differential scanning calorimetry	示差走査熱量測定
DVS	Dynamic vapor sorption	動的水分吸脱着測定
NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁気共鳴スペクトル測定
RH	Relative humidity	相対湿度
TG	Thermal gravimetry	熱重量測定
XANES	X-ray absorption near-edge structure	X線吸収端近傍構造
XRPD	X-ray powder diffraction	粉末 X線回折測定

目次

序論	1
第 1 章 エチドロン酸二ナトリウム四水和物結晶の物性評価	4
第 1 節 緒言	4
第 2 節 実験材料及び実験方法	5
2.1. 実験材料	5
2.2. 非晶質、Form I、Form II 及び Form III の粉末試料の調製	5
2.3. X 線粉末回折測定	5
2.4. 熱測定	5
2.5. 動的水分吸脱着測定	6
2.6. 単結晶 X 線構造解析	6
2.7. XANES スペクトル測定	6
第 3 節 結果及び考察	7
3.1. 加熱による四水和物結晶(Form I)の脱水	7
3.2. 無水物結晶と非晶質の動的水分吸脱着測定	11
3.3. 四水和物結晶(Form I)の単結晶構造	14
3.4. 結晶と非晶質の XANES スペクトル測定	17
第 4 節 小括	22
第 2 章 エチドロン酸二ナトリウム非晶質の物性比較	24
第 1 節 緒言	24
第 2 節 実験材料及び実験方法	27
2.1. 実験材料	27
2.2. Form I 及び非晶質の調製	27
2.3. X 線粉末回折測定	27
2.4. 熱測定	27
2.5. 動的水分吸脱着測定	28
2.6. ¹ H NMR 測定	28

2.7.	ラマンスペクトル測定	28
2.8.	XANES スペクトル測定	28
第3節	結果及び考察	29
3.1.	X線粉末回折測定及び熱測定	29
3.1.1.	非晶質の安定性	29
3.1.2.	非晶質の水分量	31
3.1.3.	非晶質のガラス転移、脱水及び結晶化	35
3.1.3.1.	ガラス転移及び脱水	36
3.1.3.2.	結晶化	37
3.1.3.3.	熱挙動が異なる要因	39
3.2.	動的水分吸脱着測定	41
3.3.	ラマンスペクトル測定	43
3.4.	XANES スペクトル測定	45
第4節	小括	47
第3章	XANES スペクトル測定によるビスホスホネート原薬の特性解析	48
第1節	緒言	48
第2節	実験材料及び実験方法	50
2.1.	実験材料	50
2.2.	水和物結晶の粉末試料の調製	50
2.3.	X線粉末回折測定	50
2.4.	単結晶 X線構造解析	50
2.5.	XANES スペクトル測定	53
第3節	結果及び考察	54
3.1.	X線粉末回折測定	54
3.2.	単結晶 X線構造解析	56
3.3.	XANES スペクトル測定	62
第4節	小括	68
総括		69
謝辞		71

論文目録	72
参考文献	73

序論

医薬品原薬のエチドロン酸二ナトリウムは、化学構造中の炭素に2つのリン酸基が結合したビスホスホネート系原薬の一つである(Fig. 1)。ビスホスホネートは破骨細胞を介した骨吸収を阻害し、骨粗鬆症やページェット病などの骨疾患の治療に広く用いられている(1)。

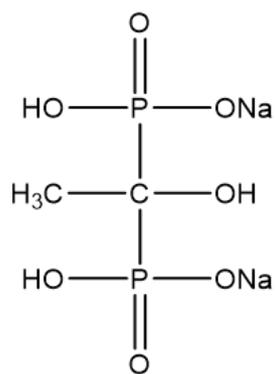
医薬品の経口固形製剤の製造において、原薬の物性は製造性、安定性及び有効性に影響を及ぼす可能性があるため、物性評価が不可欠である。しかし、エチドロン酸二ナトリウムの結晶転移、非晶質化、脱溶媒及び吸湿等の物性の詳細は明らかになっていない。

原薬の物性評価には、X線粉末回折法、熱分析法、動的水分吸脱着測定法、赤外吸収スペクトル法、ラマンスペクトル法、固体NMR法及びX線単結晶構造解析法などの測定手法が利用されているが(2-7)、本研究では原薬の評価手法としては新規の測定手法であるX線吸収端近傍構造(XANES)スペクトル測定法に着目した(8)。

XANESスペクトル測定法は、試料にX線を照射してX線のエネルギー(波長)別の吸光度を測定する手法である。測定対象であるX線吸収原子のK殻などの電子が励起されるのに必要なエネルギー値において、吸光度が急激に増加する領域を吸収端といい、その吸収端から約50 eVまでのスペクトル形状はXANESと呼ばれる。XANESスペクトルは、X線吸収原子の電子状態により特有の形状を示すため、X線吸収原子の電子状態に影響を及ぼす相互作用に関する情報を得ることが可能である。

XANESスペクトル測定法の優れた特徴として、高い元素特異性が挙げられる。ある元素が医薬品原薬のみに含まれる場合、製剤中の添加剤など別成分が多量に存在する試料であっても、その元素のXANESスペクトルから原薬で形成される相互作用についての情報を得ることが可能である(9,10)。医薬品における対象元素としては、ヘリウム雰囲気下又は空気中で測定可能なケイ素以上の原子番号の元素となり、これまでの研究において、リン(1章、2章、3章)、塩素(10,11,12)、臭素(9,13,14)、および硫黄(15, 16)といった原子を含む種々の原薬の結晶形や非晶質の判別手法としてXANESスペクトル測定法を適用できることが報告されている。これら以外にも、原薬の結晶や非晶質といった固体だけでなく、液体や気体の測定も可能であること、測定は非破壊的であること、ppmオーダーの濃度でも検出できる感度の高さもXANESスペクトル測定法の特徴である。

以下、第 1 章では、XANES スペクトル測定法を含む種々の手法を用いて、エチドロン酸二ナトリウム四水和物結晶の物性の詳細を評価した。第 2 章では、エチドロン酸二ナトリウムの非晶質に着目し、非晶質の製法が及ぼす物性への影響について詳細に評価した。第 3 章では、エチドロン酸二ナトリウムを含むビスホスホネート系原薬 6 種の XANES スペクトルを測定し、原薬の X 線吸収原子の相互作用が XANES スペクトル形状に与える影響を解析した。



Molecular weight: 249.99

Figure 1. Chemical structure and molecular weight of disodium etidronate.

第1章 エチドロン酸二ナトリウム四水和物結晶の物性評価

第1節 緒言

序論のとおり、医薬品原薬の物性評価は経口固形製剤の製造において重要であるが、エチドロン酸二ナトリウムについては、四水和物結晶の結晶構造が報告されているものの(17)、結晶転移、非晶質化、脱溶媒及び吸湿等の物理的性質の詳細は明らかになっていない。

そこで本研究では、X線粉末回折、熱分析法、動的水分吸脱着測定法及びX線単結晶構造解析法を用いてエチドロン酸二ナトリウムの四水和物結晶の物性評価を行った。また、本研究では上記の手法に加えて、新規の測定手法であるXANESスペクトル測定法(8)による測定も行った。

以前の研究において、化学構造に塩素原子を含む医薬品原薬であるモサプリドに対し、Cl-K吸収端XANESスペクトル測定により結晶多形の識別が可能であることや、クラリスロマイシン塩酸塩のCl-K吸収端XANESスペクトル測定により、結晶中の塩化物イオンが塩酸溶液中の塩化物イオンと同様に完全に水和されていることを示唆する結果が報告されている(11,12)。これらの研究は医薬品原薬の塩素原子を対象とした測定であったが、医薬品原薬中の他の元素については、XANESスペクトル測定法は本研究の以前は行われていなかった。エチドロン酸二ナトリウムは2つのリン酸基を含み、リン原子はXANESスペクトル測定法に適した測定対象である。本研究では、リン酸基を含む医薬品原薬の結晶及び非晶質に対し、P-K吸収端XANESスペクトル測定法を初めて適用した。

第 2 節 実験材料及び実験方法

2.1. 実験材料

非晶質のエチドロン酸二ナトリウムは住友ファーマから入手した。他の試薬はすべて特級を使用した。

2.2. 非晶質、Form I、Form II 及び Form III の粉末試料の調製

エチドロン酸二ナトリウムの結晶は、四水和物結晶の Form I、無水物結晶の Form II 及び Form III がある。

四水和物結晶の Form I は、入手したエチドロン酸二ナトリウムを恒温恒湿庫 LH33-12M(ナガノサイエンス)に 40°C90%RH で 7 日間保管することにより調製した。

非晶質は、Form I を 75°C で 24 時間、恒温庫内で加熱することにより調製した。

無水物結晶の Form II は、Form I を 160°C で 4 時間、恒温庫内で加熱することにより調製した。

無水物結晶の Form III は、Form I を 250°C で 1 時間、恒温庫内で加熱することにより調製した。

2.3. X 線粉末回折測定

以下の測定は、Cu K α X 線、電流 40 mA、電圧 45 kV の条件で、Empyrean (PANalytical) を用いて実施した。

XRPD 測定は室温で、回折角 4–40°(2 θ)、ステップサイズ 0.017°、スキャンスピード 0.033°/秒で測定した。

昇温 XRPD 測定は、40–280°C までの 10°C 毎に、回折角 4–40°(2 θ)、ステップサイズ 0.026°、スキャンスピード 0.067°/秒で測定した。

75°C の XRPD 測定は、75°C で 1 時間毎に、回折角 4–40°(2 θ)、ステップサイズ 0.026°、スキャンスピード 0.067°/秒で測定した。

2.4. 熱測定

DSC 測定は DSC2500 (TA Instruments) を用いた。ピンホールを開けたリッドで蓋をしたアルミパンに試料を約 5 mg 充填し、窒素流量 50 mL/分、昇温速度 10°C/分、温度範囲 25–350°C で測定した。

TG 測定は TGA5500 (TA Instruments) を用いた。開放系のプラチナパンに試料を約 5

mg 充填し、窒素流量 25 mL/分、昇温速度 10°C/分で、温度範囲 25–350°Cで測定した。

2.5. 動的水分吸脱着測定

DVS 測定は、IGAsorp (Hiden Analytical)を用いた。約 10 mg の試料をステンレスのマイクロメッシュコーン上に乗せ、25°Cの窒素環境下、5%RH または 10%RH の湿度変化幅で 0%–90%RH の範囲で測定した。

2.6. 単結晶 X 線構造解析

入手したエチドロロン酸二ナトリウム約 25 mg を、80°Cで水/アセトニトリル(1:1)1 mL に溶解した。この溶液を密封し、室温で 2 日間静置したところ、溶液中に針状の Form I の単結晶が認められた。この結晶をろ過回収し、室温減圧下で 1 時間乾燥した。

加熱により Form I から結晶転移することで得られる Form II と Form III は微小な結晶であり、単結晶 X 線構造解析に適する結晶は調製できなかった。

単結晶 X 線回折測定は、Rigaku XtaLAB P200 (リガク)を用いて、Mo K α X 線、測定温度 93 K で測定した。構造決定は SHELXT (18)、SHELXL (19)、ShelXle (20)を用いた。結晶構造および回折データは、Cambridge Structural Database に登録した(CCDC 番号 2097632)。

2.7. XANES スペクトル測定

あいちシンクロトロン光センター(愛知県瀬戸市)の BL6N1 ビームラインで XANES スペクトルを測定した。Form I、Form II 及び非晶質を、導電性両面二重カーボンテープに載せ、XANES チャンバーにセットした。測定温度 25°Cのヘリウム雰囲気下、K₂SO₄ の S-K 吸収端のピークトップが 2481.7 eV になるように X 線エネルギーを校正した。XANES スペクトルは全電子収率モードで測定し、ATHENA ソフトウェア(21)を用いて XANES スペクトルのデータ処理を行い、XANES スペクトルにおける吸収端の前後で吸光度の差が 1 になるように規格化した。

第3節 結果及び考察

3.1. 加熱による四水和物結晶(Form I)の脱水

温度の上昇に伴う Form I の XRPD パターンの変化を Fig. 2a に示す。XRPD パターンは 40 - 70°C の範囲で変化しなかった。80°C においてピーク強度は低下し、新しいピークは認められなかったことから、Form I から非晶質への転移と考えられた。この Form I からの非晶質化は、Form I を 75°C の一定温度に保つと、XRPD パターンが 24 時間で非晶質特有のハローパターンに徐々に変化することからも明らかとなった(Fig. 2b)。90°C では、Form I のピークは消失し、新しいピークが認められたことから、Form I が非晶質化した後に別の結晶形(Form II)へと結晶化が進行したと考えられた。90-160°C の範囲では、Form II のピーク強度は徐々に増加した。さらに加熱すると、XRPD パターンは 160-280°C の範囲で別のパターンへと緩やかに変化し、さらに別の結晶形(Form III)に転移することが明らかとなった。この Form II から Form III への緩やかな転移は、転移における活性化エネルギーが高いことに起因する可能性がある。また、室温での XRPD パターンは Form II に特有な 8.5° のピークと Form III に特有な 9.0° のピーク等の 2θ 値が異なっていたが、2 つの XRPD パターンは類似しており、その差は小さかったことから、Form II と Form III の結晶構造も類似していると推測された(Fig. 2c)。これらの Form II、Form III 及び非晶質の XRPD パターンは、室温でシリカゲルを用いて少なくとも 4 週間保存した後も維持されており、低湿度の保存においては安定であることが明らかとなった(Fig. 2c)。

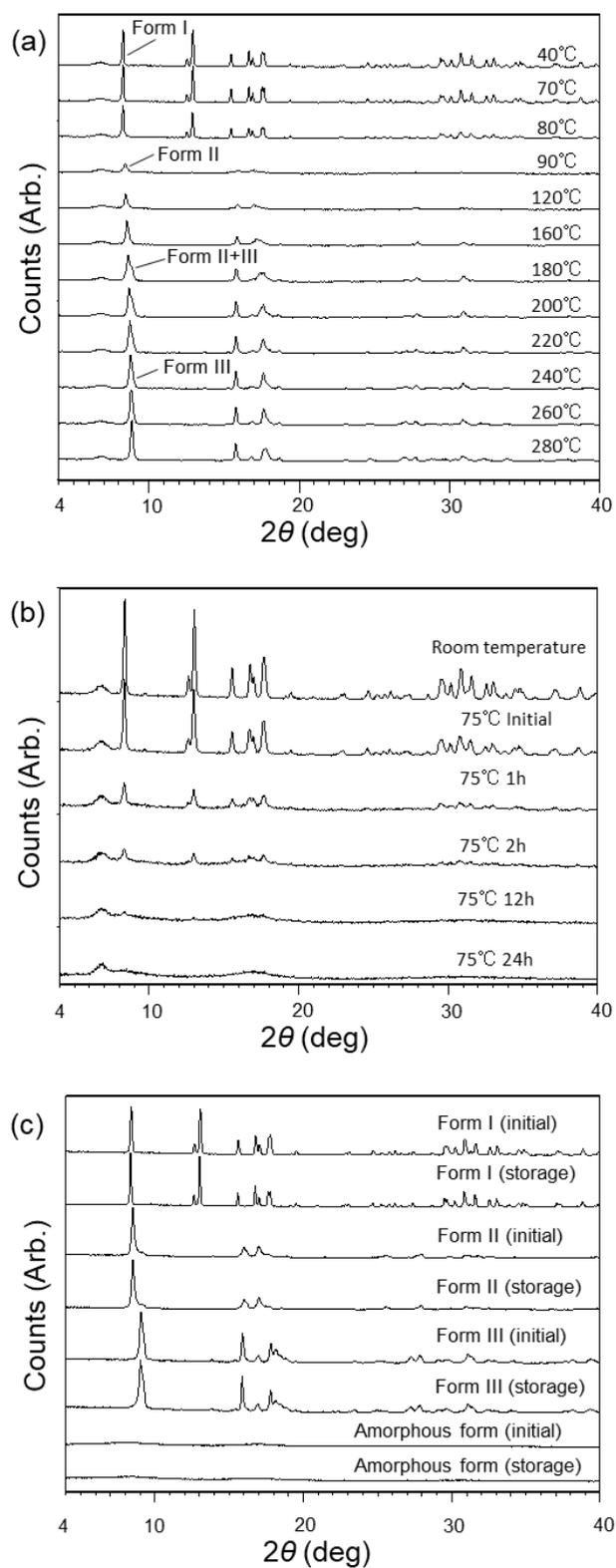


Figure 2. Dehydration of form I by heating. (a) XRPD patterns of form I at different temperatures. (b) XRPD patterns of form I at 75°C. (c) XRPD patterns of crystals (form I, form II, and form III) and amorphous form before and after storage. Form I was stored at room temperature at least 4 weeks. Form II, form III and amorphous form were stored at room temperature with silica gel at least 4 weeks.

Form I の熱測定の結果、70–120°Cの範囲で吸熱ピーク及び 22.7%の質量減少が認められ、水分子 4 つ分の質量減少の理論値 22.4%と一致したことから、この質量減少を伴う吸熱反応は脱水であると考えられた(Fig. 3a)。また、70–120°Cの吸熱ピーク中に発熱ピークが 95°C付近で認められ、非晶質から Form II への結晶化熱であると考えられた。さらに、130–250°Cの範囲では幅広い吸熱ピークが認められた(Fig. 3b)。この吸熱反応は、XRPD 測定においても同様の 160–280°Cの範囲で結晶転移が観察されたことから(Fig. 2a)、Form II から Form III への結晶転移によるものと考えられた。Form II から Form III への吸熱を伴う転移は、Form II と Form III がそれぞれ結晶転移温度以下と以上で安定な結晶であることを示唆している。Form III は、結晶転移温度以下に冷却しても Form II にはならず、室温で Form III を維持していた(Fig. 2c)。昇温時における Form II から Form III への緩やかな転移にも示唆されるように、Form III から Form II への転移の活性化エネルギーは非常に大きいため、転移は室温で進行しなかったと推測された。質量減少を伴わない 300°Cにおける吸熱ピークは Form III の融解、質量減少を伴う 310°C以上の吸発熱ピークは、エチドロン酸二ナトリウムの分解である可能性が考えられた(Fig. 3)。

以上の XRPD 測定と熱測定の結果から、四水和物結晶の Form I は加熱により脱水を伴いながら非晶質化し、更なる加熱により非晶質から無水物結晶である Form II への結晶化を経て、最終的に Form III に転移することが明らかとなった。

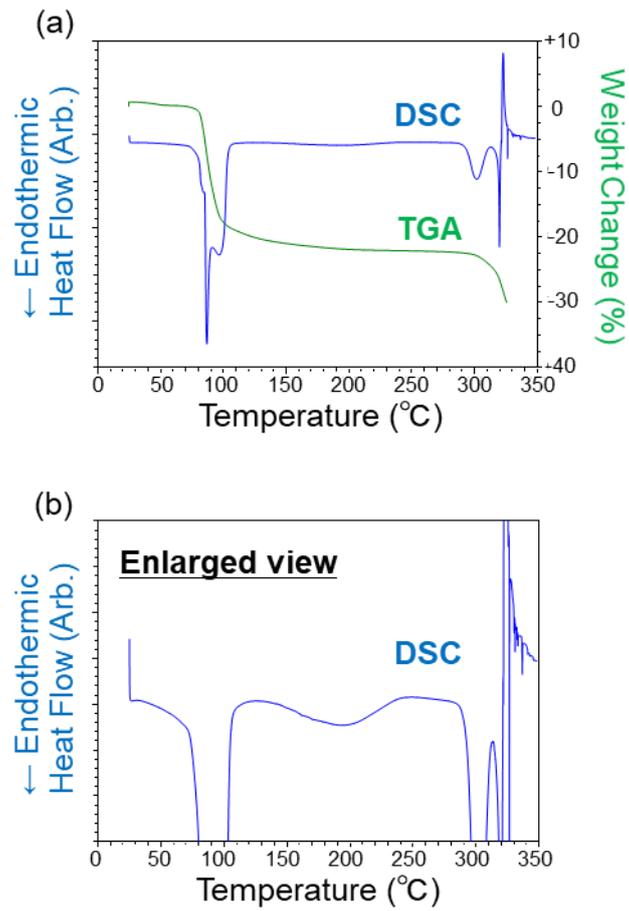


Figure 3. Thermal analyses of form I. (a) Overall view. (b) Enlarged view.

3.2. 無水物結晶と非晶質の動的水分吸脱着測定

Form II、Form III 及び非晶質の DVS 測定結果を Fig. 4a-c に示す。0-90%RH での 1st サイクルで 0%RH から 90%RH に上昇させたときは、Form II、Form III 及び非晶質の質量が約 26-32%増加し、これはエチドロン酸二ナトリウムの 1 分子当たり 4 つの水分子に相当(理論値：28.8%)する質量増加であった。また、DVS 測定後の XRPD パターンは四水和物結晶である Form I のパターンであった(Fig. 5)。以上から、Form II、Form III 及び非晶質が無水物であり、これらの試料は吸湿によって Form I に転移することが明らかとなった。非晶質、Form II 及び Form III はそれぞれ 60%RH、75%RH 及び 80%RH で大きな質量増加を示したことから、3 つの無水物(Form II、Form III 及び非晶質)の中で湿度に対して非晶質が最も不安定であり、Form III が最も安定であった。一方、Form II、Form III 及び非晶質が Form I に転移した後である 2nd サイクル以降においては、いずれの試料についても質量は 0-90%RH の範囲で一定であったことから、Form I への転移が不可逆的であり、Form I が室温で最も安定な固体状態であることと考えられた。また、Form I から加熱して調製した Form II、Form III 及び非晶質が DVS 測定後に再度 Form I に復元したことから、試料調製時に加熱してもエチドロン酸二ナトリウムの大部分は分解していないと推測された。

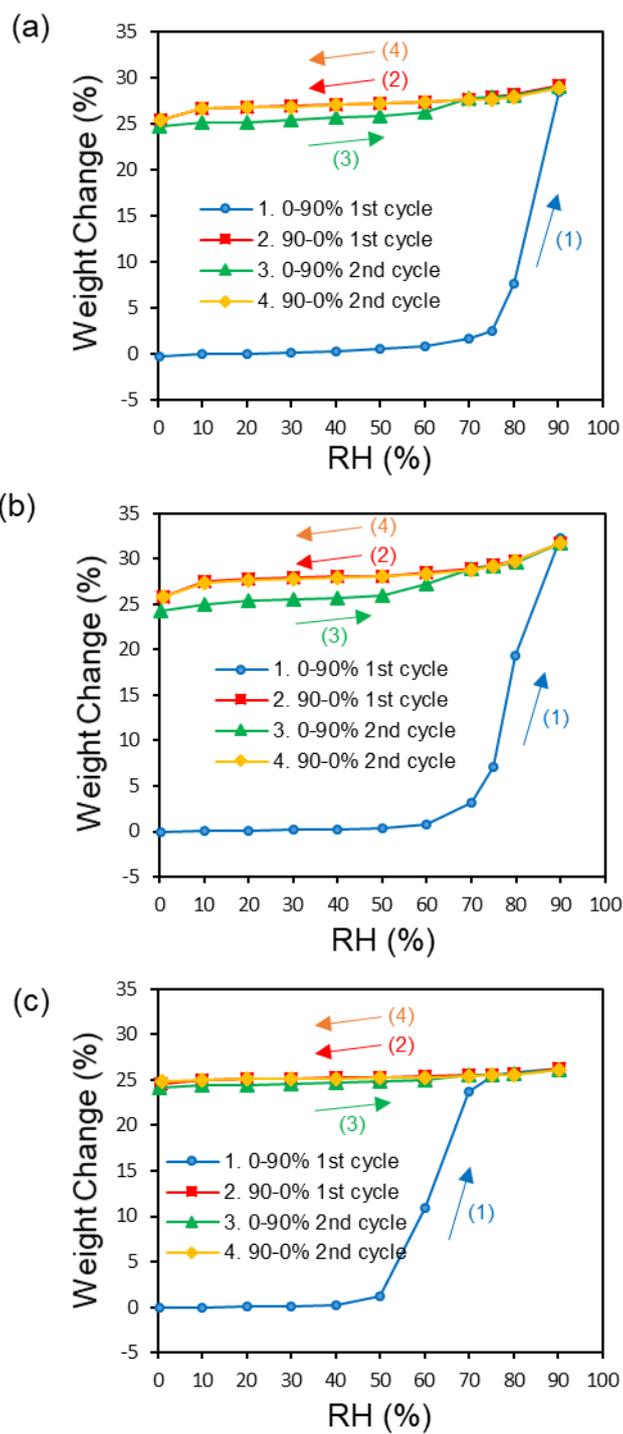


Figure 4. Hydration of anhydrate crystals and amorphous form by water absorption. DVS analysis of (a) form II, (b) form III, and (c) amorphous form.

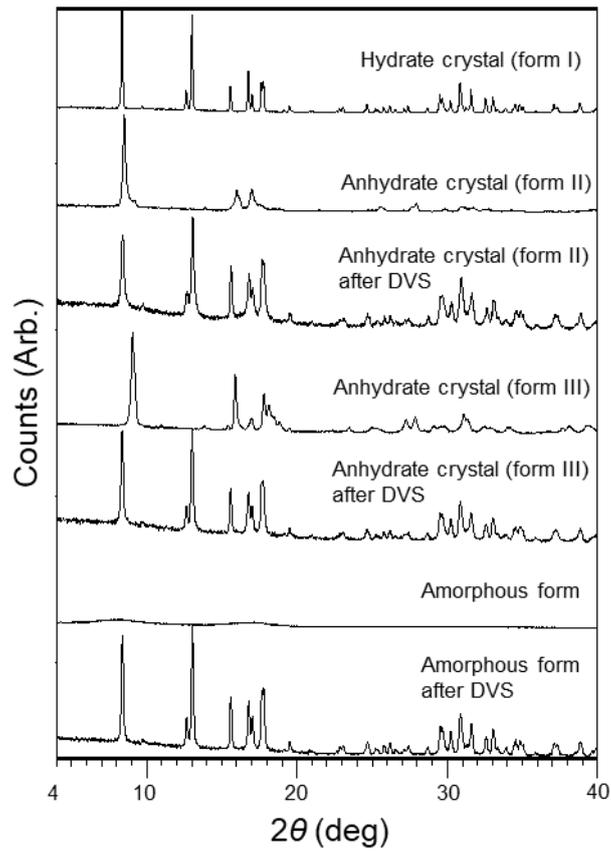


Figure 5. XRPD patterns of anhydrate crystals and amorphous form before and after DVS measurements.

3.3. 四水和物結晶(Form I)の単結晶構造

リン酸基の電荷状態とリン酸基に結合した水素原子の座標が、過去に報告された Form I の結晶構造では解明されていなかったため、93 K の低温で測定した高分解能の X 線回折データを用いて、単結晶の構造決定と精密化を行った(Table 1 及び Fig. 6a)。この精度の良いデータを用いて精密化を実施することで、リン酸基の電荷状態と結合した水素原子の座標が明らかになった(Fig. 6b)。リン原子に共有結合している 3 つの酸素原子のうち、1 つはプロトン化されていた。他の 2 つは、酸素とリンの結合距離が同等であった(P(1)のリン酸基では 1.513(1) Å と 1.505(1) Å、P(2)のリン酸基では 1.507(1) Å と 1.510(1) Å、(結合距離の()内の数値は標準誤差)ことから、-1 の負電荷が 2 つの酸素原子に非局在化していると推測された。また、精密化により、4 つの水分子のうちの 3 つには乱れがあり、2 通りの位置を取ることが明らかになった。なお、それらの占有率は同等の 0.502 と 0.498 であった。結晶中において水分子は *b* 軸に平行に形成されたチャンネル様構造に集まっていた(Fig. 6c)。このチャンネル様構造により、加熱により水分子がチャンネルを通過して容易に脱離することが可能となっていると推察された。チャンネル様構造を通じた複数の水分子の脱離は、結合の弱い水分子が最初に脱離し、その後、結合の強い水分子が脱離するという複数のステップで進行する可能性がある(22,23)。分子位置に乱れのない水分子(O8)については、ナトリウムイオンと 2 つの配位結合を形成していたことから、結晶中で強固に結合していると考えられた。一方、配位結合を 1 つまたは全く形成しない他の 3 つの水分子(O9、O10、O11)は、結合が弱いために乱れが生じている可能性が考えられた。このように、4 つの水分子の分子間相互作用は差異があることが示唆されたが、Form I の熱測定においては、4 つの水分子全てが加熱によりほぼ同時に脱離する結果が得られている。3 つの乱れのある水分子が加熱によって脱離した際に、水素結合と配位結合のネットワークが緩まり、結晶中に空隙が形成されたために、結合の強い水分子(O8)の速やかな脱離が促進された可能性がある。また、Form I の結晶構造は、脱離した 4 つの水分子と、水分子によって形成された水素結合と配位結合が失われた際に崩壊し、非晶質に転移したと考えられた。

Table 1 Crystallographic data of form I.

Crystal data	
Chemical formula	$C_2H_6O_7P_2 \cdot Na_2 \cdot 4(H_2O)$
Space group	$P2_1/c$
Cell parameters	$a = 10.5176(2) \text{ \AA}$
	$b = 5.97018(13) \text{ \AA}$
	$c = 18.1576(4) \text{ \AA}$
	$\beta = 92.086(2)^\circ$
Crystal size	$25 \mu\text{m} \times 33 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$
Temperature	93 K
Diffraction data	
Wavelength	Mo $K\alpha$
No. of reflections	
Measured	52705
Unique	3094
$(\sin\theta/\lambda)_{\text{max}}$	0.699
R_{int}	0.0549
Refinement	
$R, wR(F^2)$ (all reflection)	0.0304, 0.0700
Goodness-of-fit	0.946
$\Delta\rho_{\text{max}}, \Delta\rho_{\text{min}}$	$0.52 \text{ e/\AA}^3, -0.44 \text{ e/\AA}^3$

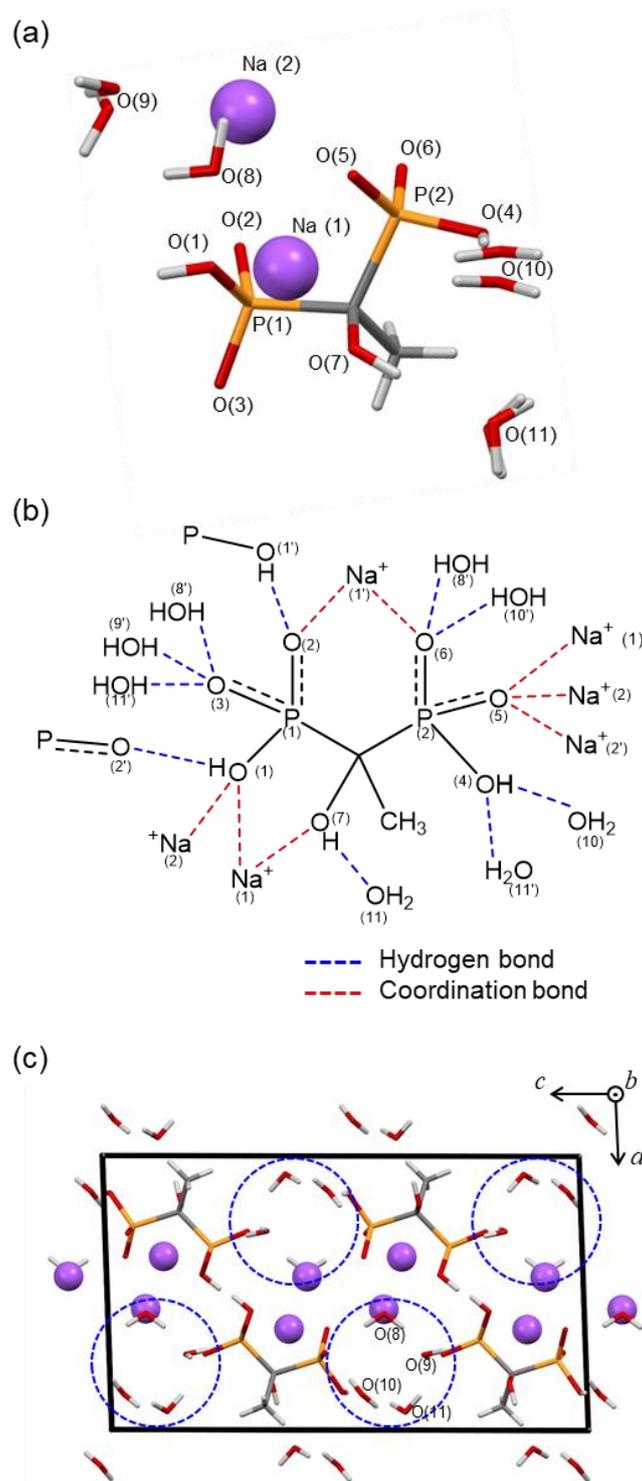


Figure 6. Single crystal structure of form I. (a) Molecular structure of form I. H, C, O, and P atoms are shown in white, gray, red, and orange, respectively. Na ions are shown as violet spheres. (b) Hydrogen bonds and coordination bonds of form I. Atom identification numbers are shown in parentheses, and those of symmetry-related atoms are marked with primes. (c) Crystal packing of form I. Disordered water molecules with smaller occupancies are omitted for clarity. The water molecules clustered in the channels are marked with blue dashed circles.

3.4. 結晶と非晶質の XANES スペクトル測定

本研究では、低温の温度帯における Form I から非晶質及び Form II への転移に着目し、これらの XANES スペクトルを測定した(Fig. 7)。これらの XANES スペクトルは Fig. 8 に示すとおり、高い再現性で得られた。Form I、Form II 及び非晶質の XANES スペクトルは全体として類似したスペクトルとなったが、2151.5 eV の最大ピークの周辺と 2154–2174 eV の範囲で差異が認められた。2151.5 eV 付近のピークトップは幅広く平坦となっており、特に Form II のピークトップの形状は二峰性となっていた。2166 eV 付近の 2 番目に高いピークも Form I と非晶質では幅広いピークとなっていた。さらに、Form II では 2163 eV 付近に小さな肩のピークが認められ、スペクトルは 2 つのスペクトルの重なりであることが示唆された。エチドロン酸二ナトリウムは 2 つのリン酸基を有しており、XANES スペクトルは 2 つのリン原子のスペクトルが平均化されたものである。エチドロン酸分子中に形成される 2 つのリン原子の共有結合は同一であるため(Fig. 1)、2 つのリン原子の XANES スペクトルの違いは、リン酸基の酸素原子で形成される分子間相互作用の違いに起因すると考えられる。Form I の結晶構造から、2 つのリン酸基の間で分子間相互作用が異なること、特にナトリウムイオンとの配位結合が異なることが明らかとなっている(Fig. 6b、Table 2)。P(1)のリン酸基では、プロトン化されている酸素原子(O1)で 2 つ、プロトン化されていない酸素原子(O2)で 1 つ、ナトリウムイオンとの配位結合を形成しており、プロトン化されている酸素原子との配位結合が主であった。なお、プロトン化されていない酸素原子(O3)は水分子とのみ水素結合を形成していた。一方、P(2)のリン酸基では、プロトン化されていない酸素原子(O5)で 3 つ、プロトン化されていない酸素原子(O6)で 1 つ、ナトリウムイオンと配位結合を形成しており、プロトン化されていない酸素原子との配位結合のみであった。また、プロトン化されている酸素原子(O4)は水分子と 2 つの水素結合を形成していた。P(2)のリン酸基の配位結合の距離は 2.299(1)–2.442(1) Å であったが、P(1)のリン酸基の配位結合の距離は全体的に長く、2.353(1)–2.769(1) Å であった。酸素原子とリン原子との共有結合の距離は、プロトン化されていない酸素原子の場合(1.505(1)–1.513(1) Å)の方が、プロトン化されている酸素原子の場合(1.580(1)–1.588(1) Å)よりも短くなっていた。プロトン化されていない酸素原子と配位結合の形成は、より短い共有結合を介してリン原子の電子軌道の形状やエネルギーに大きな影響を与える可能性があり、2 つのリン原子の XANES スペクトルの差異や Form I、Form II 及び非晶質間の差異の要因であると推測された。

Form I、Form II 及び非晶質の XANES スペクトルの中でも、特に Form I と非晶質のスペクトルは類似しており、非晶質でのリン酸基で形成されている相互作用が Form I と類似していることが示唆された。前項の記載のとおり、非晶質は、Form I の水分子が結晶中のチャンネル様構造を通過して脱離することによって生成すると推測される。この脱水の過程において、結晶格子が崩壊して非晶質へと転移するが、リン酸基とナトリウムイオンの間の相互作用様式はある程度維持されていた可能性が考えられた。また、Form I と非晶質のスペクトルの差が小さかったことから、リン酸基の酸素原子と水分子間の水素結合が XANES スペクトルのピーク形状に与える影響は小さいことが示唆された。一方、Form I と Form II とのスペクトルの差はより大きく、リン酸基の酸素原子とナトリウムイオン間の配位結合が、Form I と非晶質との差と比較して Form I と Form II との差の方が大きくなっている可能性が考えられた。以上から、P-K 吸収端 XANES スペクトル測定により、リン酸基を含む原薬の結晶形の同定又は判別に適用可能であることが示された。

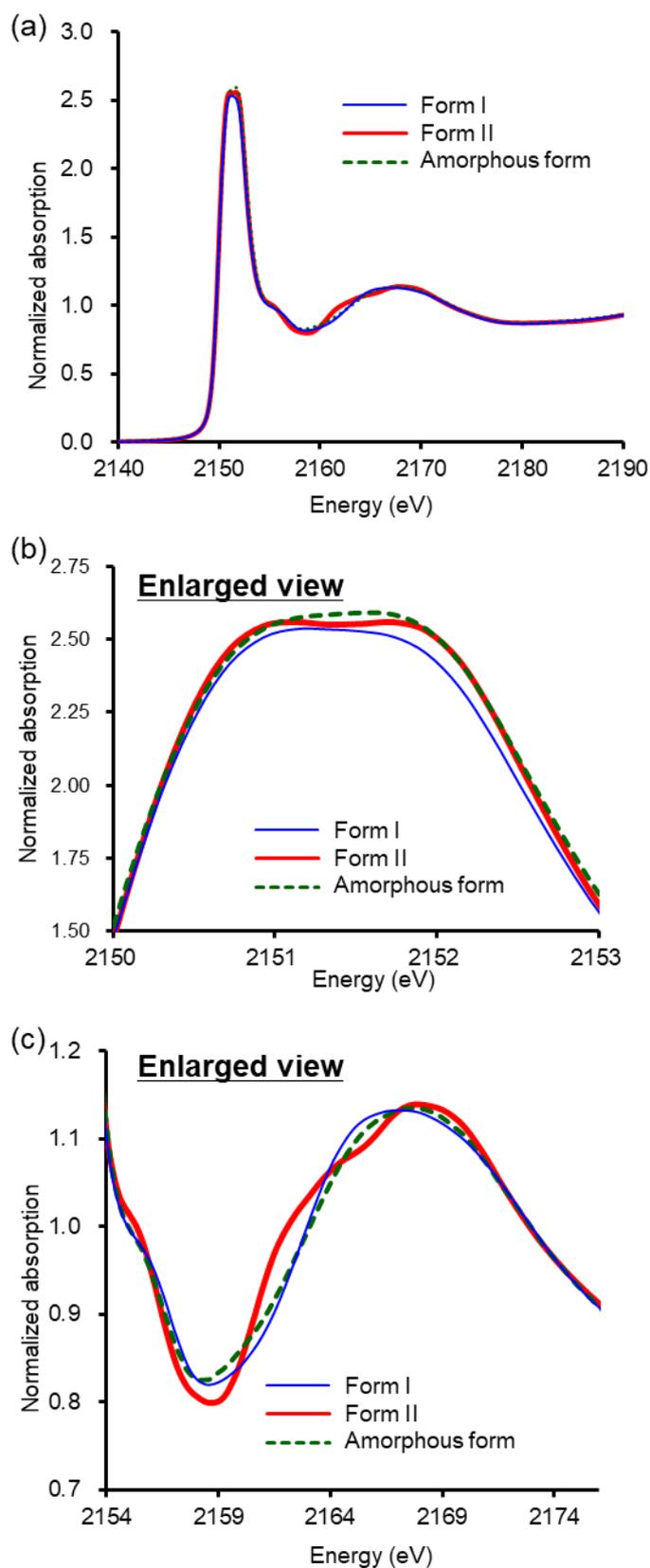


Figure 7. Phosphorus K-edge XANES spectra of form I, form II, and amorphous form. (a) Overall view. Enlarged views: (b) around the highest peak-top at 2150–2153 eV and (c) around the second-highest peaks at 2154–2174 eV.

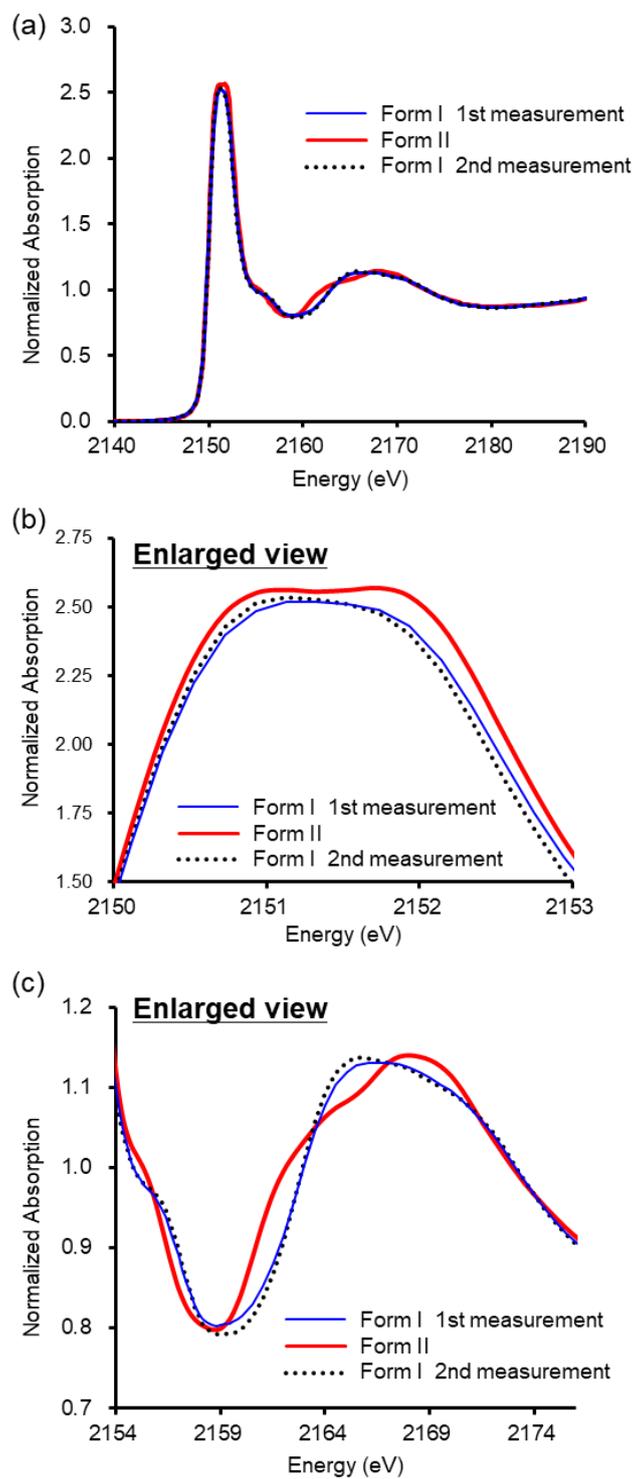


Figure 8. Phosphorus K-edge XANES measurements of form I was carried out (2nd measurement) after measuring the form I (1st measurement) and form II XANES spectra to confirm the reproducibility. (a) Overall view and (b) (c) enlarged views.

Table 2 Coordination bonds and hydrogen bonds formed at the phosphate moieties.

Bond type	P(1) phosphate moiety		P(2) phosphate moiety	
	Atoms* ¹	Distance* ² (Å)	Atom* ¹	Distance* ² (Å)
Coordination bond	P-O(1)H Na(1)	2.414(1)	P=O(5) Na(1)	2.442(1)
	P-O(1)H Na(2)	2.769(1)	P=O(5) Na(2)	2.386(1)
	P=O(2) Na(1')	2.353(1)	P=O(5) Na(2')	2.340(1)
			P=O(6) Na(1')	2.299(1)
Hydrogen bond	P-O(1)H P=O(2')	2.599(1)	P-O(4)H H ₂ O(10)	2.579(4), 2.606(4)
	P=O(2) P-O(1')H	2.599(1)	P-O(4)H H ₂ O(11')	2.934(6), 2.954(6)
	P=O(3) H ₂ O(8')	2.752(1)	P=O(6) H ₂ O(8')	2.795(1)
	P=O(3) H ₂ O(9')	2.910(7), 2.747(9)	P=O(6) H ₂ O(10')	2.714(5), 2.706(6)
	P=O(3) H ₂ O(11')	2.760(4), 2.739(6)		

*1 Numbers of crystallographically symmetry-related atoms are marked with primes.

*2 Distances between O and Na atoms of coordination bonds and between O atoms of O-H...O hydrogen bonds with their standard errors of the last digits in parentheses. In the cases of disordered water molecules, two distances are shown, with the conformers of occupancies 0.502 and 0.498.

第4節 小括

XRPD 測定と熱測定の結果から、四水和物結晶の Form I は加熱により脱水を伴いながら非晶質化し、更なる加熱により非晶質から無水物結晶である Form II への結晶化を経て、最終的に Form III に転移することが明らかとなった(Fig. 9)。DVS 測定において、室温では 60 - 80%RH で Form II、Form III、非晶質が吸湿して Form I を形成したが、湿度を 0%RH に下げても Form I は安定であったことから、Form I が通常的环境下で最安定形であり、エチドロン酸二ナトリウムの固形製剤の製造における原薬形態として適していると考えられた。Form I 以外を原薬形態として選択する場合、原薬及び製剤の保管は湿度管理が必要である。以上の知見は、エチドロン酸二ナトリウムの固形製剤の製造にとって非常に重要である。

P-K 吸収端 XANES スペクトル測定の結果、Form I、Form II 及び非晶質の間で異なるスペクトルが得られ、P-K 吸収端 XANES スペクトル法により、リン酸基を含む原薬の結晶形の同定又は判別が可能であることが初めて実証された。XANES スペクトル法は、原薬の結晶及び非晶質の評価に有用な手法であり、製剤の品質評価にも有用と期待される。

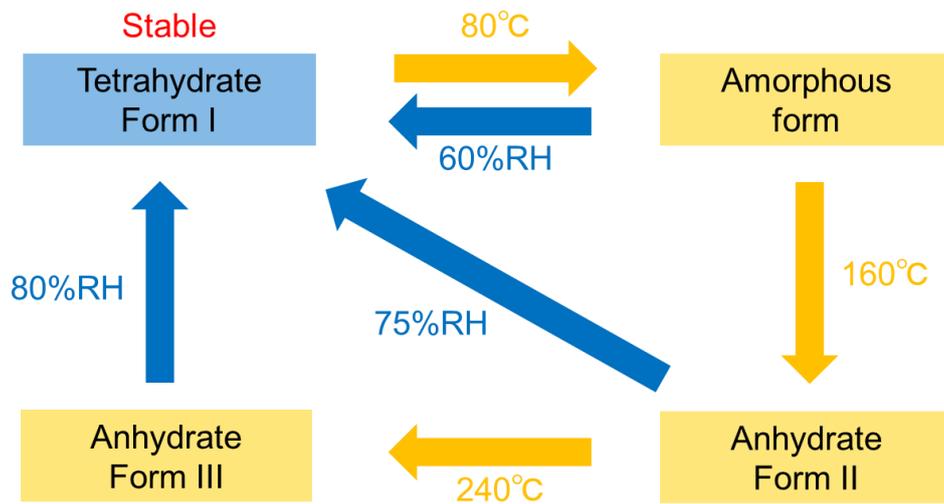


Figure 9. Schematic for phase transition of disodium etidronate.

第 2 章 エチドロン酸二ナトリウム非晶質の物性比較

第 1 節 緒言

第 1 章の研究結果のとおり、エチドロン酸二ナトリウムは四水和物結晶である Form I が通常的环境下で最も安定な結晶形であり、エチドロン酸二ナトリウムの固体制剤の製造に適した原薬形態のひとつと考えられる。

一方、薬局方では、エチドロン酸二ナトリウムの水分量に関する品質規格が設定されている(24,25)。米国薬局方では、水分値：5.0%以下(カールフィッシャー法)、日本薬局方では、乾燥減量：5.0%以下(210°C、2 時間)の品質規格が設定されている。Form I の水分量の理論値は 22.4%であり、Form I は薬局方で規定されている水分量の品質規格を満たさないため、最安定形であるにも関わらず、エチドロン酸二ナトリウムの原薬形態として選択できない状況となっている。したがって、Form I 以外の原薬形態である、非晶質や無水物結晶(Form II、Form III)を選択する必要があるが、これらの原薬形態は第 1 章の研究結果のとおり、吸湿により Form I へと転移することから、吸湿性に関する懸念があるが、低湿度下では安定であるため、低湿度に管理すれば原薬形態として選択することができる。無水物結晶の Form II と Form III については、調製時に 150°C を超える高温での加熱が必要であり、熱分解の潜在的なリスクが増加すると推測されるので、原薬形態としては適さないと考えられた。加熱を伴わない調製方法についても、エチドロン酸二ナトリウムは水には溶けやすいが、有機溶媒には非常に溶けにくいことから、非含水系の有機溶媒から再結晶することで Form II や Form III を調製することは困難であることが想定される。そこで、本研究では、エチドロン酸二ナトリウムの原薬形態として非晶質に注目した。

ビスホスホネートの水和物結晶の物理的特性は報告事例があるが(2-5)、エチドロン酸二ナトリウムを含めたビスホスホネートの非晶質の結晶化、吸湿性及び水分量等の物理的性質についてはほとんど報告されておらず、さらに、非晶質の製造方法が物理的性質に及ぼす影響についてはこれまで検討されていない。本研究では、加熱乾燥法、凍結乾燥法及び貧溶媒添加法の 3 つの製造方法を用いて、エチドロン酸二ナトリウムの非晶質を調製した(Fig. 10)。第 1 章の研究のとおり、Form I を 80°C 付近で加熱乾燥することで非晶質に転移するため、加熱乾燥法として採用し、非晶質 H と命名した。凍結乾燥法と貧溶媒添加法は、非晶質を調製するための一般的な技術であるため(26-29)、本研究においても採用し、それぞれ非晶質 F、非晶質 A と命名した。これら

3種類の非晶質の物性を、XRPD法、熱分析法、DVS法、 ^1H NMR法、ラマンスペクトル法及びXANESスペクトル法を用いて評価した。

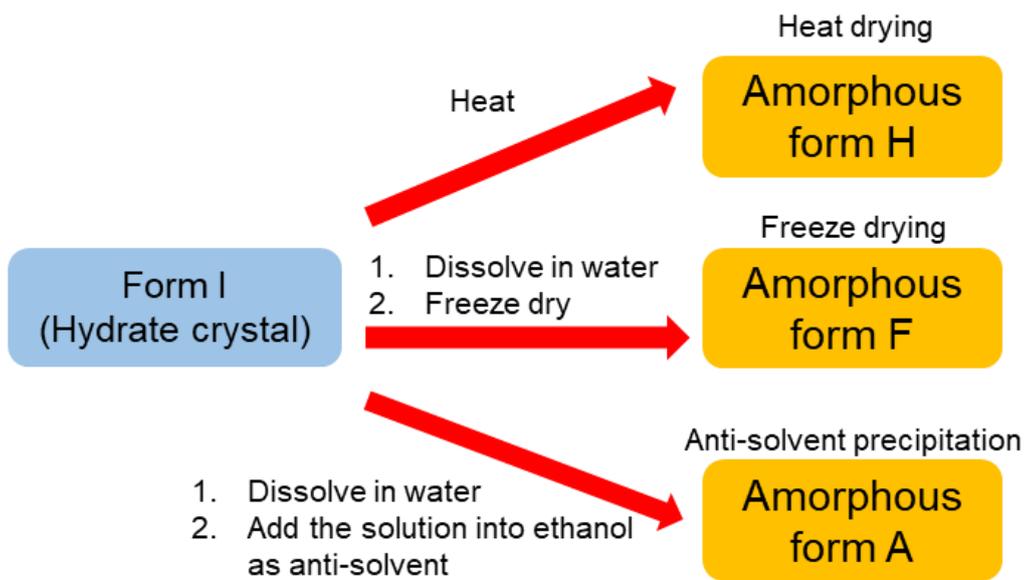


Figure 10. Manufacturing method of each amorphous form of disodium etidronate.

第 2 節 実験材料および実験方法

2.1. 実験材料

非晶質のエチドロン酸二ナトリウムは住友ファーマから入手した。他の試薬はすべて特級を使用した。

2.2. Form I 及び非晶質の調製

四水和物結晶の Form I は、入手したエチドロン酸二ナトリウムを恒温恒湿庫 LH33-12M(ナガノサイエンス)に 40°C90%RH で 7 日間保管することにより調製した。

加熱乾燥法の非晶質 H は、Form I 約 250 mg を 80°C で 24 時間、減圧乾燥下の恒温庫内で加熱することにより調製した。

凍結乾燥法の非晶質 F は、Form I 約 250 mg を水 20 mL に室温で溶解し、この溶液を -70°C のドライアイス-アセトン浴中で 5 分間、急速凍結させた後、凍結乾燥機 FDU-1200(東京理化工械)を用い、トラップ温度 -45°C で 24 時間乾燥することにより調製した。

貧溶媒添加法の非晶質 A は、Form I 約 250 mg を水 1 mL に室温で完全に溶解し、この溶液を室温で攪拌(750 rpm、10-20 分間)しながら、貧溶媒としてエタノール 250 mL 中に加え、析出した試料をろ過回収し、室温で 24 時間減圧乾燥することで得た。

これらの非晶質は、測定に使用するまで室温でシリカゲル入りの容器で保存した。

2.3. X 線粉末回折測定

以下の測定は、Cu K α X 線、電流 40 mA、電圧 45 kV の条件で、Empyrean (PANalytical) を用いて実施した。

XRPD 測定は室温で、回折角 4-40°(2 θ)、ステップサイズ 0.017°、スキャンスピード 0.033°/秒で測定した。

昇温 XRPD 測定は、40 - 280°C までの 10°C 毎に、回折角 4-40°(2 θ)、ステップサイズ 0.026°、スキャンスピード 0.067°/秒で測定した。

2.4. 熱測定

DSC 測定及び Modulated DSC 測定は、ピンホールを開けたリッドで蓋をしたアルミパンに試料を約 5 mg 充填し、DSC2500 (TA Instruments)を用いて実施した。

DSC 測定は、窒素流量 50 mL/分、昇温速度 10°C/分、温度範囲 25-350°C で測定した。

Modulated DSC 測定は、窒素流量 50 mL/分、昇温速度 2°C/分、温度範囲 25-300°C、

変調振幅 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、変調周期 60 秒で測定した。

TG 測定及び等温 TG 測定は、開放系のプラチナパンに試料を約 5 mg 充填し、TGA5500 (TA Instruments)を用いて実施した。

TG 測定は、窒素流量 25 mL/分、昇温速度 $10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で、温度範囲 $25\text{--}350^{\circ}\text{C}$ で測定した。

等温 TG 測定は、温度範囲 $25^{\circ}\text{C}\text{--}80^{\circ}\text{C}$ まで昇温速度 $10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で加熱し、 80°C で 24 時間保持した後、温度範囲 $80^{\circ}\text{C}\text{--}350^{\circ}\text{C}$ まで昇温速度 $10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で加熱した。窒素流量はいずれも 25 mL/分であった。

2.5. 動的水分吸脱着測定

DVS 測定は、IGAsorp (Hiden Analytical)を用いた。約 10 mg の試料をステンレスのマイクロメッシュコーン上に乗せ、 25°C の窒素環境下、5%RH または 10%RH の湿度変化幅で 0%RH から 90%RH の範囲で測定した。

2.6. ^1H NMR 測定

^1H NMR 測定は、5 mm のスピナーを使用し、AV400M NMR (Bruker)により室温で実施した、非晶質 A 約 5 mg を D_2O 約 0.75 mL に溶解し、NMR チューブに移した。 ^1H NMR スペクトルは、エタノールのメチルプロトンケミカルシフト 1.2 ppm に設定し、積算回数 16 回で取得した。

2.7. ラマンスペクトル測定

ラマンスペクトル測定は室温で、FT-Raman MultiRAM (Bruker)を用いて実施した。ガラス管に試料約 5 mg を充填し、測定レーザー波長 1064 nm、測定範囲 $70\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ 、分解能 4 cm^{-1} 、積算回数 128 回で測定した。

2.8. XANES スペクトル測定

あいちシンクロトロン光センター(愛知県瀬戸市)の BL6N1 ビームラインで XANES スペクトルを測定した。非晶質を、導電性両面二重カーボンテープに載せ、XANES チャンバーにセットした。測定温度 25°C のヘリウム雰囲気下、 K_2SO_4 の S-K 吸収端のピークトップが 2481.7 eV になるように X 線エネルギーを校正した。XANES スペクトルは全電子収率モードで測定し、ATHENA ソフトウェア(21)を用いて XANES スペクトルのデータ処理を行い、XANES スペクトルにおける吸収端の前後で吸光度の差が 1 に

なるように規格化した。

第3節 結果

3.1. X線粉末回折測定及び熱測定

3.1.1. 非晶質の安定性

いずれの非晶質の XRPD パターンについても、非晶質特有のハローパターンを示したことから(Fig. 11a、b)、3つの方法で非晶質を調製できることが明らかとなった。また、これらの非晶質はシリカゲル入りの容器内に室温で6か月以上保存しても非晶質を維持していたことから、低湿度下の保存ではいずれの非晶質も結晶化せず、安定であることが明らかとなった。

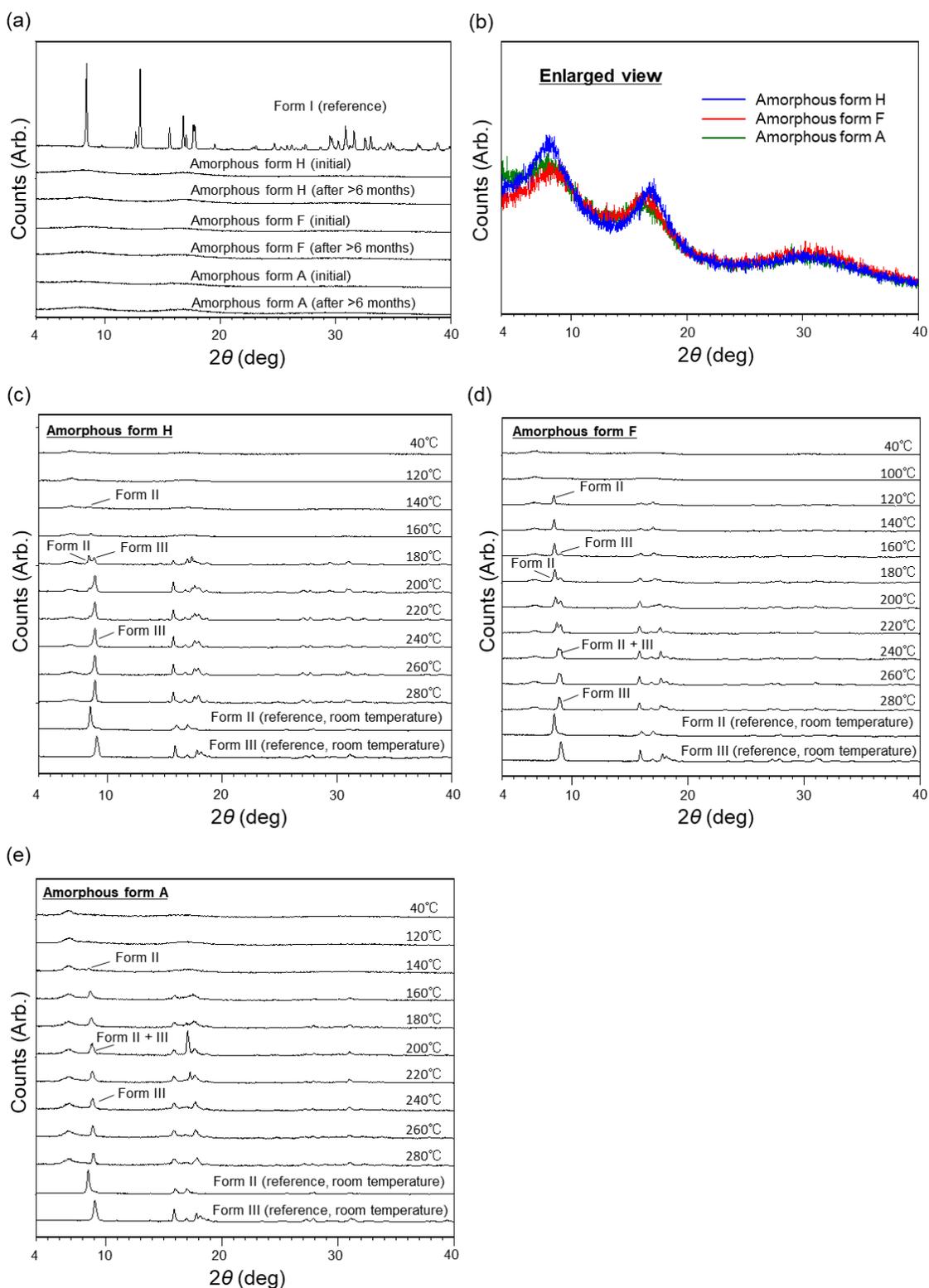


Figure 11. (a) XRPD patterns of amorphous forms before and after storage. Amorphous forms were stored at room temperature with silica gel at least 6 months. (b) Enlarged view of XRPD patterns of amorphous forms. Variable temperature XRPD patterns of (c) amorphous form H, (d) amorphous form F, and (e) amorphous form A.

3.1.2. 非晶質の水分量

熱測定の結果、いずれの非晶質も、300℃付近において質量減少を伴う吸発熱ピークを示し(Fig. 12a-c)、エチドロン酸二ナトリウムの分解によるものと考えられた。分解温度以下における非晶質 H、F、A の質量減少はそれぞれ 3.9%、10.0%、11.2%であった(Table 3)。非晶質 H、F の質量減少は、これらの非晶質の調製には水のみを使用していることから、脱水によるものと推測された。一方、非晶質 A の調製には水とエタノールを使用しており、質量減少は水、エタノール又はその両方の脱離によるものと推測された。¹H-NMR により定量した非晶質 A 中のエタノール量は 1.3% (w/w、エチドロン酸二ナトリウム 1 分子に対してエタノール 0.07 分子相当)であり、質量減少のほとんどは水分によるものと考えられた。

非晶質 H の水分量は 3.9%(エチドロン酸二ナトリウム 1 分子に対して水 0.6 分子相当)、非晶質 F、A の水分量はそれぞれ 10.0%、9.9%(エチドロン酸二ナトリウム 1 分子に対して水 1.5 分子相当)であった。非晶質 H の水分量は非晶質 F、A の約 1/3 であり、非晶質 H のみが薬局方で規定される水分の許容基準である 5.0%以下を満たしていた。水に一旦溶解して調製される非晶質 F、A とは違い、非晶質 H は Form I を加熱することで直接調製する製法となっている。第 1 章の研究結果のとおり、Form I の結晶中において、水分子はチャンネル様構造を形成している。加熱乾燥させた際に、このチャンネル様構造を介して水分子が容易に脱離することができるため、非晶質 F、A と比較して、非晶質 H の水分量が低くなった可能性があると考えられた。

非晶質 H の脱水挙動を詳細に調べるため、Form I から非晶質 H を調製する際と同じ条件下(80℃)で Form I の等温 TG 測定を行ったところ、24 時間で 21.1%(エチドロン酸二ナトリウム 1 分子に対して水 3.8 分子相当)、その後の 80℃-300℃の加熱で 1.5%(エチドロン酸二ナトリウム 1 分子に対して水 0.3 分子相当)の質量減少を示した(Fig. 12d)。後者の値(水 0.3 分子相当)は、実際の調製方法で調製した非晶質 H の水 0.6 分子相当と同程度であり、わずかな差の原因は調製時のサンプル量の違いによるものと考えられる。実際の調製方法における非晶質 H のサンプル量は 250 mg であったが、等温 TG 測定での非晶質 H のサンプル量は約 5 mg であり、等温 TG 測定の方が小スケールであったため脱水しやすかった可能性がある。また、これらの結果は、少量の水分子が 80℃で 24 時間の加熱後においても、非晶質 H に残留することを示した。第 1 章の研究結果のとおり、Form I の 4 つの水分子のうちの 1 つは 2 つの配位結合を介してナトリウム

イオンに強固に結合しており、この水分子が非晶質 H に残留していた原因である可能性が考えられた。

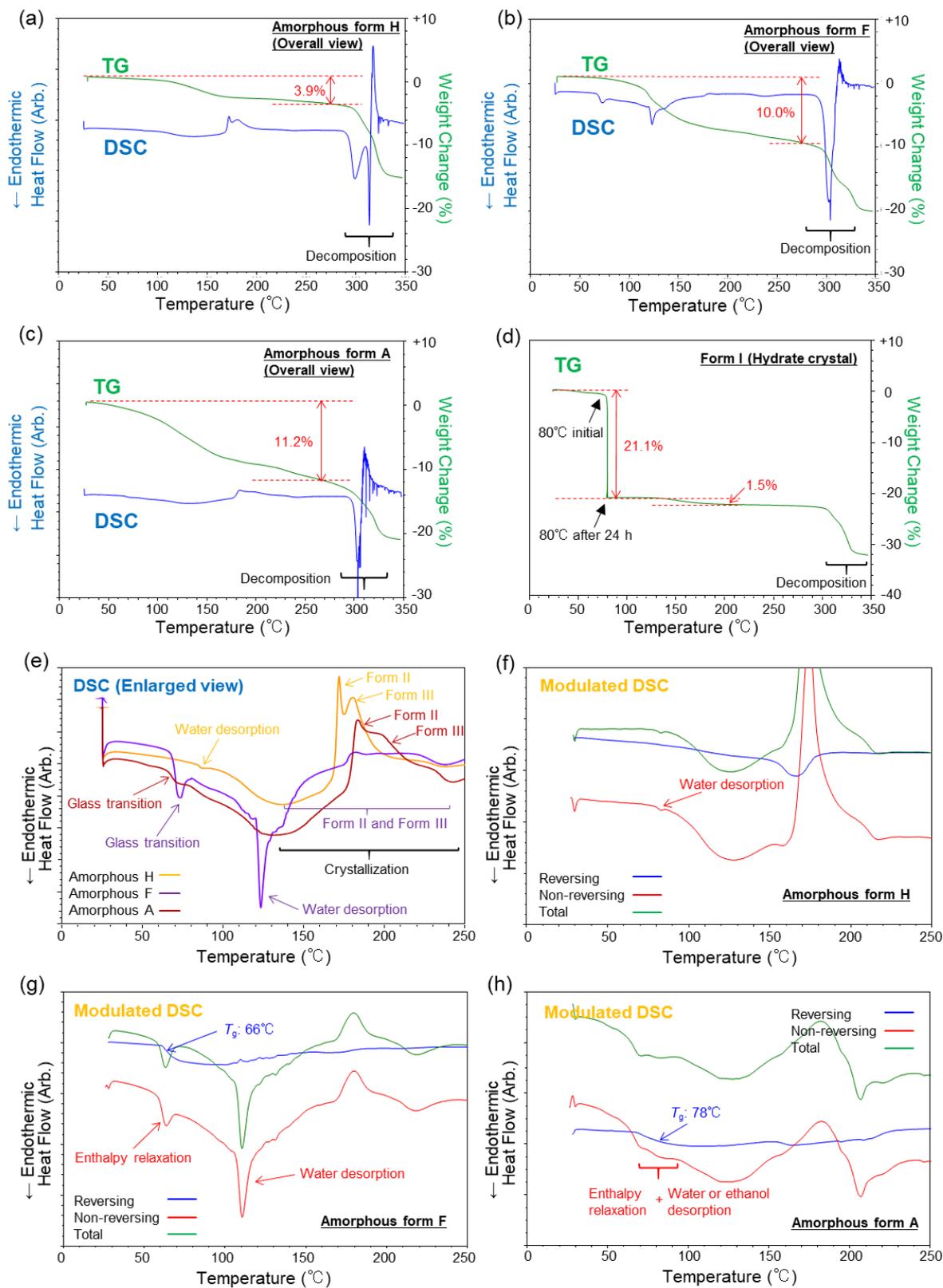


Figure 12. DSC and TG data of (a) amorphous form H, (b) amorphous form F, and (c) amorphous form A. (d) Isothermal TG curves of form I. (e) Enlarged view of DSC curves of amorphous forms. Modulated DSC curves of (f) amorphous form H, (g) amorphous form F, and (h) amorphous form A.

Table 3 Weight change of each sample by TG and DVS.

Sample	Observed weight change		Theoretical weight change ^{*1}
	TG	DVS	DVS
Amorphous form H	-3.9%	+26.3%	+23.8%
Amorphous form F	-10.0%	+18.2%	+15.9%
Amorphous form A	-11.2%	+18.8%	+14.4% ^{*2}

*1 The theoretical weight change of the transition from amorphous disodium etidronate to tetrahydrate crystal, taking into account the amounts of water molecules originally contained in amorphous forms. The calculation formula: $(100\% + \text{TG}\%) \times (M_1 + M_2 \times 4) / M_1 - 100\%$, where M_1 and M_2 are molecular weights of disodium etidronate (249.99) and water (18.02), respectively.

*2 The amount of ethanol (1.3%) is ignored.

3.1.3. 非晶質のガラス転移、脱水及び結晶化

DSC 測定、Modulated DSC 測定、昇温 XRPD 測定により、3 つの非晶質はガラス転移、脱水及び結晶化温度に違いがあることが明らかになった(Table 4)。

Table 4 Summary of the differences among amorphous forms.

Sample	Amorphous form H	Amorphous form F	Amorphous form A
Molecular mobility estimated by the preparation method	Low	High	Medium
Water content by TG	3.9%	10.0%	9.9%*1
Glass transition point (T_g) by modulated DSC	Not observed (170°C)	66°C	78°C
Water desorption peak temperature by DSC	90°C	120°C	70-90°C
Water desorption peak temperature by modulated DSC	80°C	110°C	60-90°C
Crystallization temperatures by DSC	Form II and Form III: 140-230°C Form II: 170°C*2 Form III: 180°C*2	Form II and Form III: 130-240°C	Form II and Form III: 140-240°C Form II: 180°C*2 Form III: 190°C*2
Crystallization temperatures by variable temperature XRPD	Form II: 140°C Form III: 180°C	Form II: 120°C Form III: 160°C	Form II: 140°C Form III: 180-220°C

*1 The amount of ethanol (1.3%) is subtracted.

*2 The temperature at the apex of the exothermic peak.

3.1.3.1. ガラス転移及び脱水

DSC 測定の結果、非晶質 H は 90°C 付近に小さな吸熱ピーク、非晶質 F は 70°C 付近と 120°C 付近に 2 つの吸熱ピーク、非晶質 A は 70°C 付近に小さな吸熱ピークが認められた(Fig. 11e)。これらの吸熱ピークの原因を調べるために、非晶質について Modulated DSC の測定を実施した(Fig. 12f-h)。Modulated DSC は熱量変化の可逆的な成分と不可逆的な成分を分離することが可能であり、それぞれ reversing heat flow と non-reversing heat flow として示される。非晶質のガラス転移は reversing heat flow においてベースラインの吸熱方向へのシフトとして観測されるが、非晶質 H の reversing heat flow では、ベースラインシフトは認められなかった(Fig. 12f)。非晶質 H のガラス転移点(T_g)は、後述するように結晶化温度(170°C)付近であると推測される。一方、非晶質 F、A の reversing heat flow では、それぞれ 66°C、78°C においてガラス転移によるベースラインシフトが認められた(Fig. 12g, h)。

非晶質 H、F の non-reversing heat flow では、それぞれ 80°C 付近、110°C 付近に吸熱ピークが認められたが(Fig. 12f, g)、reversing heat flow ではガラス転移のベースラインシフトを示さなかったこと、TG 測定においてもこれらの温度付近で質量減少を示したことから(Fig. 12a, b)、これらの吸熱ピークは脱水によるものと推測された。非晶質 F の non-reversing heat flow における 66°C での吸熱ピークは、reversing heat flow においてガラス転移点が 66°C に認められたことから、非晶質のガラス転移に伴い観測される現象であるエンタルピー緩和によるものと考えられた(Fig. 12g)。非晶質 A の non-reversing heat flow では、60–90°C の間でいくつかの吸熱ピークが重なっていた(Fig. 12h)。Reversing heat flow では 78°C でガラス転移が認められ(Fig. 12h)、TG 測定においてもガラス転移点の 78°C を含む広い温度範囲で質量減少が認められたことから、non-reversing heat flow におけるこれらの吸熱ピークはエンタルピー緩和と水・エタノールの脱離の両方を反映している可能性が考えられた。非晶質 F の non-reversing heat flow で認められた脱水ピークは 110°C であり(Fig. 12g)、非晶質 H、A よりも高く、かつ水の沸点である 100°C よりも高かった。非晶質 F は凍結乾燥法で調製する際にエチドロン酸二ナトリウムを水に溶解させて調製するが、水溶液中に溶解したエチドロン酸二ナトリウム分子は完全に水和されている状態であるため、水とエチドロン酸二ナトリウム分子の間に多数の水素結合による相互作用が形成されると推測される。この相互作用により、非晶質 F の脱水温度が高くなったと考えられた。

3.1.3.2. 結晶化

昇温 XRPD 測定において、いずれの非晶質も 100°C 又は 120°C まで非晶質特有のハローパターンが維持されたが(Fig. 11c-e)、無水物結晶の Form II に特有な 8.5° のピークが非晶質 F では 120°C、非晶質 H、A では 140°C で認められ、さらに加熱すると、いずれの非晶質についても Form II のピーク強度が徐々に増加したことから、Form II の結晶化が徐々に進行したと考えられた。また、無水物結晶の Form III に特有な 9.0° のピークは、非晶質 H では 180°C、非晶質 F では 160°C で認められ、さらに加熱すると、非晶質 H、F では、Form II のピーク強度は次第に減少し、逆に Form III ピーク強度は増加した。これは、Form II から Form III への結晶転移と非晶質から Form III への結晶化によるものと考えられた。非晶質 A においても、8.5° の Form II 由来のピークが 180°C 以上で 9.0° へと徐々にピークがシフトしており、非晶質 H、F と同様に、Form II から Form III への結晶転移と非晶質から Form III への結晶化が進行したと考えられた。非晶質 A の Form II と Form III のピークは明瞭に分離されなかったが、これはピークの幅がブロードであったためと考えられた。

DSC 測定において、いずれの非晶質も 130 - 240°C の広い範囲で発熱方向のベースライン上昇が認められた(Fig. 12e)。ベースラインの上昇は、緩やかな結晶化の進行、熱容量の減少、又はその両方である可能性が考えられた。また、非晶質 H では 170°C と 180°C、非晶質 A では 180°C と 190°C において、シャープな発熱ピークが認められた。第 1 章の研究結果では、Form II から Form III への転移はブロードな吸熱ピークであったため、非晶質 H、A で認められた 2 つのシャープな発熱ピークは Form II から Form III の転移ではないと考えられる。昇温 XRPD 測定においても、180°C 付近で Form II や Form III の生成が認められていることから(Fig. 11c-e)、当該の発熱ピークは非晶質から Form II や Form III への結晶化によるものと推測された。結晶化の進行は緩やかであるため、温度上昇によって、まず非晶質の一部は低温安定形である Form II へと結晶化し、さらなる温度上昇において残りの非晶質が高温安定形の Form III へと結晶化するため、非晶質から Form II と Form III への結晶化がいずれも認められたと推測される。非晶質 F の DSC 測定では 130-240°C の範囲で 1 つのブロードな発熱ピーク(ピークトップ : 180°C)が認められた(Fig. 12e)。昇温 XRPD 測定においても、同じ温度帯で Form II から Form III への結晶転移と非晶質から Form III への結晶化が認められていることから(Fig.

11d)、これらの結晶転移と結晶化のピークは非晶質 H、A と比べてブロードであるために重なり合っており、一つのピークとして検出された可能性が考えられた。

3.1.3.3. 熱挙動が異なる要因

非晶質の熱挙動（ガラス転移、脱水及び結晶化）の違いは、水分量と分子運動性の違いから生じている可能性がある(Table 4)。非晶質 H は Form I の結晶を加熱して脱水させることにより調製する製法であるが、第 1 章の研究のとおり、Form I の結晶中において、水分子はチャンネル様構造を形成している。脱水の過程において、水分子が結晶中のチャンネルを通して脱離することができるため、Form I で形成されている配位結合や水素結合といった相互作用を大きく乱すことなく非晶質化した可能性がある。これらの相互作用によって、非晶質 H の分子運動性は非晶質 A、F と比較して低くなったと考えられた。非晶質 F は凍結乾燥法において、エチドロン酸二ナトリウム分子は水溶液中に溶解して完全に水和されている状態で凍結され、減圧乾燥によって水分子が昇華されて調製される。この過程において、エチドロン酸二ナトリウム分子は結晶である Form I のような安定な分子間相互作用は形成されないため、非晶質 F の分子運動性は非晶質 H よりも高くなったと考えられた。非晶質 A は貧溶媒添加法において、水溶液中に溶解して水和されているエチドロン酸二ナトリウム分子は貧溶媒であるエタノールを加えた際に脱水、凝集し、析出する。この凝集と析出の過程において、非晶質 A のエチドロン酸二ナトリウム分子は安定な分子間相互作用を形成するが、結晶である Form I と比べると強固ではないと推測される。以上から、非晶質 A の分子運動性は、非晶質 H と比べると高いが、非晶質 F と比べると低くなったと考えられた。

高い分子運動性と水分量は、 T_g を低下させ、非晶質の結晶化温度を低下させることが知られている(30)。非晶質 F の T_g は 66°C であり、非晶質 A の 78°C より低かったが、非晶質 F の水分量は非晶質 A と同等の約 10% であった(Table 4)。これは非晶質 F の分子運動性が高いことに起因すると考えられる。非晶質 H の T_g は観察されず、結晶化の温度(約 170°C)付近と高い可能性があり、この高い T_g は、非晶質 H の分子運動性と水分量が低いことに起因すると考えられる。非晶質 F の結晶化温度は、3 つの非晶質の中で最も低かったが、これは分子運動性と水分量が高いことに起因すると考えられる。非晶質 A の水分量や推定される分子運動性は非晶質 H よりも高かったにも関わらず、非晶質 A の結晶化温度は、非晶質 H よりもわずかに高かった。この原因としては、加熱による水分子とエタノール分子の脱離の違いによるものと考えられる。非晶質 A の TG 測定において、水またはエタノールの脱離による質量減少は 25°C で始まり、 150°C を超えて、結晶化温度付近まで続いていた(Fig. 12c)。一方、非晶質 H の脱水による質量減少のほとんどは 150°C 以下で完了していた(Fig. 12a)。高温下でも非晶質 A 中に残

留する水またはエタノールは無水物結晶である **Form II** への結晶化を阻害する可能性がある。上述のとおり、非晶質 **H** の脱水は **Form I** 由来のチャネル様構造のために他の非晶質と比べて速やかに進行したと推測される。

3.2. 動的水分吸脱着測定

0–90%RH での 1st サイクルにおいて、いずれの非晶質についても質量は 50%RH 以下では一定であり、0%RH の低湿度であっても水分子は脱離しないことが明らかとなった(Fig. 13a–c)。いずれの非晶質も 50% RH 以上においては吸湿し、90%RH での非晶質 H、F、A の質量増加はそれぞれ 26.3%、18.2%、18.8%であった。これらの非晶質に元から含まれる水分量を考慮すると、これらの質量増加は、四水和物結晶である Form I への転移に伴う質量増加の理論値と近い値であった(Table 3)。DVS 測定後の XRPD パターンは、Form I のパターンとなっており、3 つの非晶質はいずれも 50%RH 以上で吸湿によって Form I に転移することが明らかとなった(Fig. 13d)。前述のとおり、非晶質 F、A はエチドロン酸二ナトリウム 1 分子に対して水 1.5 分子相当の水分量を有しており、非晶質 H は水 0.6 分子相当の水分量であるため、非晶質 F、A の水分量は非晶質 H と四水和物結晶である Form I の中間となっている。しかし、非晶質 H から Form I への転移は多段階的な変化ではなく一段階で進行し、中間的な水和状態は認められなかった。前述のとおり、非晶質 H は Form I から加熱により調製されるが、Form I で形成されている配位結合や水素結合といった相互作用がある程度は維持されている可能性があり、残存する相互作用が Form I の結晶化に必要な結晶格子の再構築を促し、中間的な水和状態を伴わずに Form I へ転移したと推測された。吸湿による結晶化の挙動は、いずれの非晶質においても、50%RH 以上で質量増加が認められた後、0–90%RH の範囲で質量は一定であり、非晶質から Form I への転移は不可逆的であることが明らかとなった。以上から、これらの非晶質を保存する際は、結晶化を避けるために湿度を 50%RH 未満に厳密に制御する必要があると考えられた。

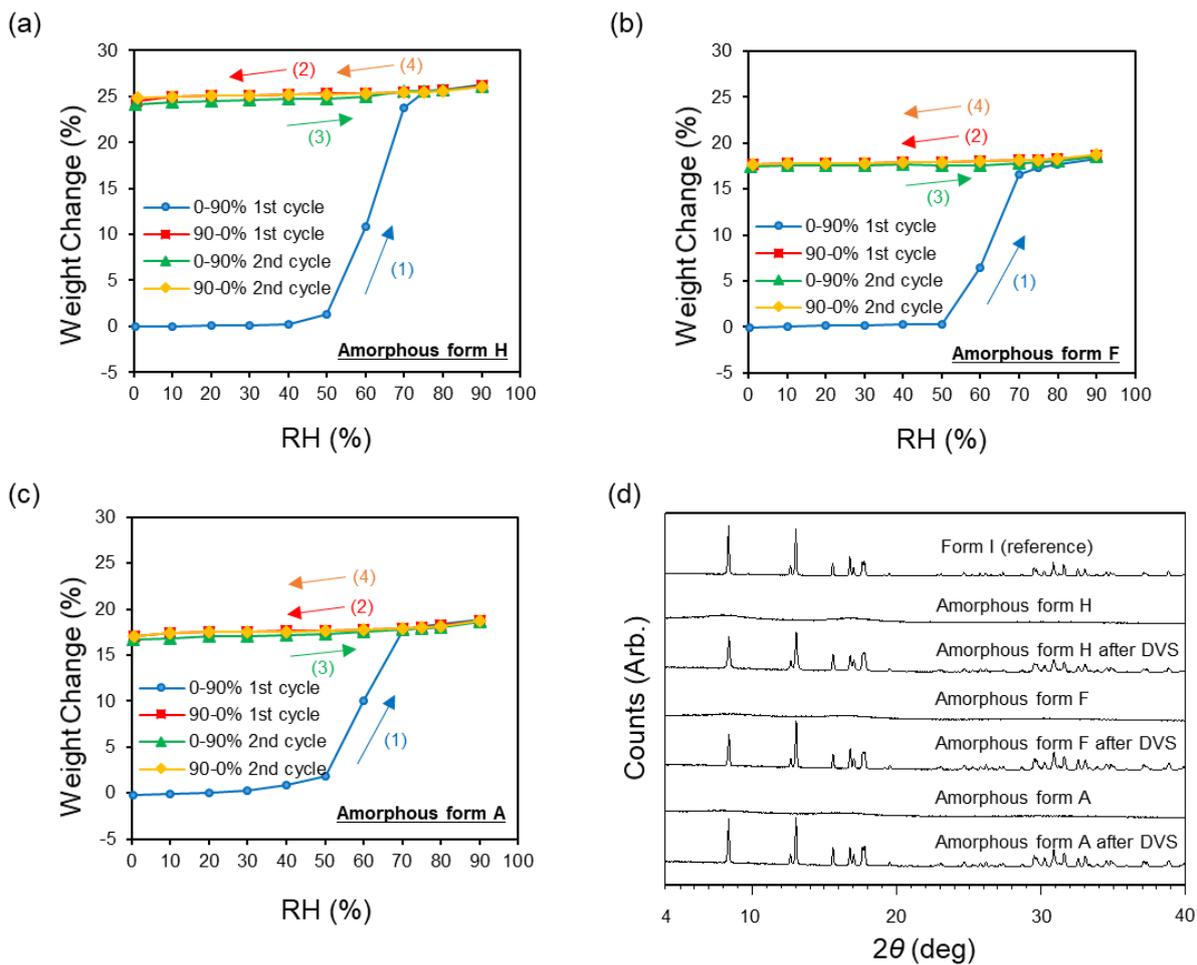


Figure 13. DVS analyses of (a) amorphous form H, (b) amorphous form F, and (c) amorphous form A. (d) XRPD patterns of amorphous forms before and after DVS measurements.

3.3 ラマンスペクトル測定

3 つの非晶質のラマンスペクトルは全体としては類似したスペクトルとなった(Fig. 14a)。しかし、ベースラインやノイズの影響を受けにくいと推測される、シャープで強度の高い 650 cm^{-1} 付近のピークに着目したところ、非晶質間でピークトップの位置にわずかな差異が認められた(Fig. 14b)。非晶質 F、A のピークは、非晶質 H に比べて低波数側にシフトが認められた。非晶質 F、A は非晶質 H に比べて水分量が多く、化合物と水との間で形成される水素結合の数も多くなると推測され、これらのピークシフトは、水素結合の影響によって生じた非晶質の構造の違いに起因する可能性が考えられた(31)。分子間配列が一定で、同一の分子間相互作用で構成される結晶とは異なり、非晶質は分子間配列が一定ではないため、種々の分子間相互作用が生じていると推測される。ラマンスペクトルは、種々の相互作用により安定化された分子構造が平均化されてスペクトルに反映されるため、全体としては類似したスペクトルとなり、ピークシフトとして非晶質間の詳細な相互作用の違いを評価することが困難であったと考えられた。

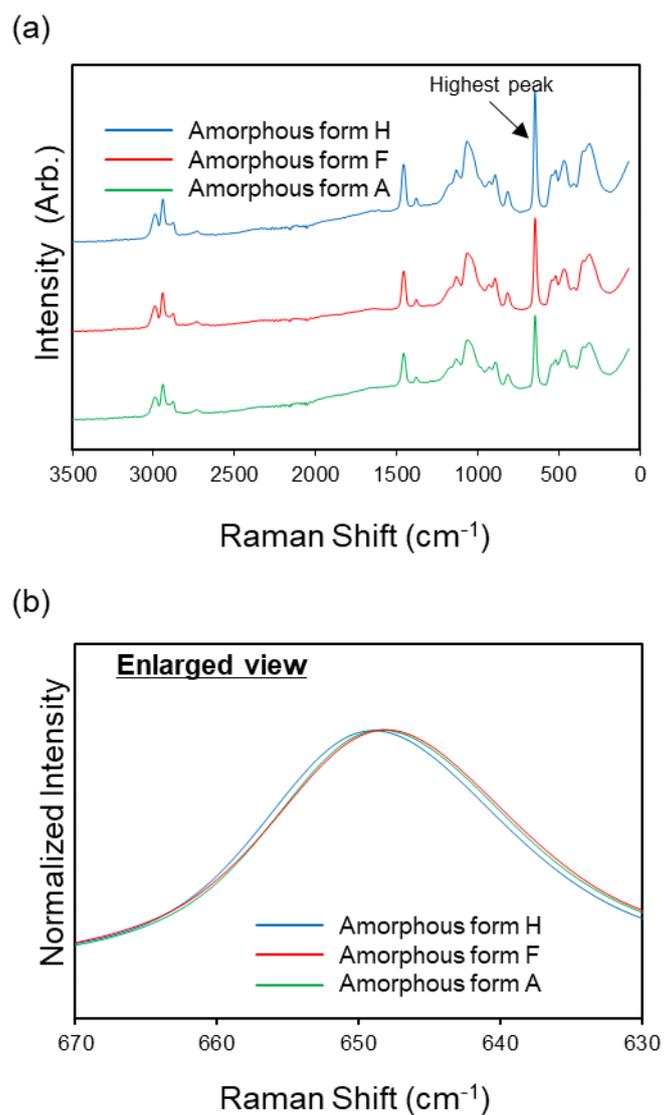


Figure 14. Raman spectra of amorphous forms. (a) Overall view. (b) Enlarged view around 650 cm^{-1} .

3.4. XANES スペクトル測定

3つの非晶質の P-K 吸収端 XANES スペクトルは、ラマンスペクトルの場合と同様に、全体としては類似したスペクトルであった(Fig. 15)。第1章の研究のとおり、エチドロン酸二ナトリウムの XANES スペクトルは、リン酸基の酸素原子と水分子との相互作用やリン酸基の酸素原子とナトリウムイオンとの相互作用により変化すると考えられる。3つの非晶質は水分量に差異があるが、XANES スペクトルはほぼ同一であったことから、非晶質の水分子が測定対象原子であるリンに関連するリン酸基ではなくナトリウムイオンと主に相互作用している可能性が考えられた。

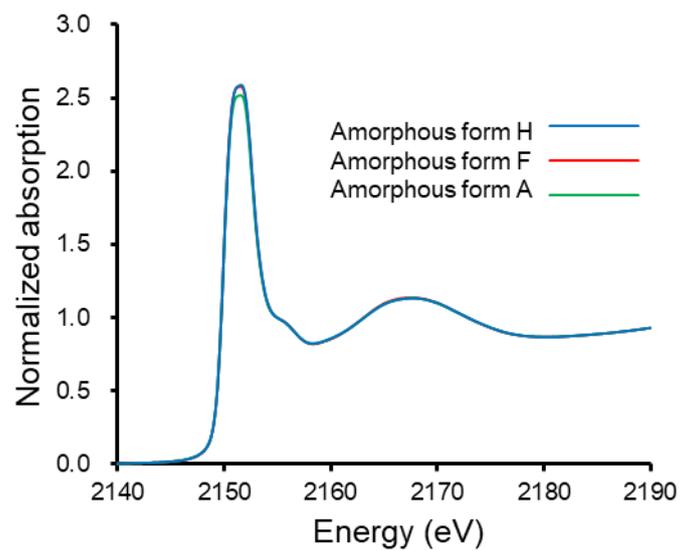


Figure 15. Phosphorus K-edge XANES spectra of amorphous forms.

第 4 節 小括

本研究では、エチドロン酸二ナトリウムの非晶質を 3 つの製造方法で調製し、非晶質の物理的性質に及ぼす製造方法の影響を初めて評価した。昇温 XRPD 測定と熱測定の結果、 T_g 、脱水、結晶化温度などの物性の点で非晶質 H、A、F 間の差異が認められたが、これらの違いは、非晶質の水分量と分子運動性の違いから生じている可能性がある。物性の差異に関連する構造的な特徴の差異は、ラマンスペクトル測定や XANES スペクトル測定のような分光学的な手法では詳細を明らかにすることができなかった。DVS 測定の結果、非晶質はいずれも 50% RH 以上で非晶質から Form I に不可逆的に転移することが確認され、これらの非晶質を保存する際は、結晶化を避けるために湿度を厳密に制御する必要があると考えられた。

3 つの非晶質のうち、水分量は非晶質 H が最も低く、非晶質 H のみが局方で規定される水分量の品質規格(5.0%以下)を満たしている点、分子運動性が低く、保存中の結晶化リスクも最も低いと考えられる点を踏まえ、非晶質 H が固形製剤の製造に最適であると考えられた。これらの物性の知見は、エチドロン酸二ナトリウムの固形製剤の製造にとって非常に重要である。

第3章 XANES スペクトル測定によるビスホスホネート原薬の特性解析

第1節 緒言

序論のとおり、固形製剤の製造には原薬の物性の評価が不可欠であり、本研究では原薬の評価手法としては新規測定手法である X 線吸収近傍構造(XANES)スペクトル測定法に着目した(8)。

エチドロン酸二ナトリウムはビスホスホネート系の原薬の一つであるが、ビスホスホネートは同じ炭素原子に結合した 2 つのリン酸基を持ち、リン原子に P-K 吸収端 XANES スペクトル測定法を適用することができる。リン酸基中のリン原子は、結晶中の隣接する分子またはイオンの原子と直接相互作用することはないが、リン酸基の酸素原子は、水素結合や配位結合を含む様々な結合を形成することができ、これらの相互作用は、リン原子の電子状態に影響を与え、P-K 吸収端 XANES スペクトルの形状変化が生じる可能性がある。しかし、原薬の X 線吸収原子の相互作用と XANES スペクトルの形状との関係については明らかとなっていない。そこで本研究では、6 種類のビスホスホネートの水和物結晶(Fig. 16)を用いて、P-K 吸収端 XANES スペクトルがリン酸基の原子間相互作用および荷電状態によってどのような影響を受けるかを調べた。

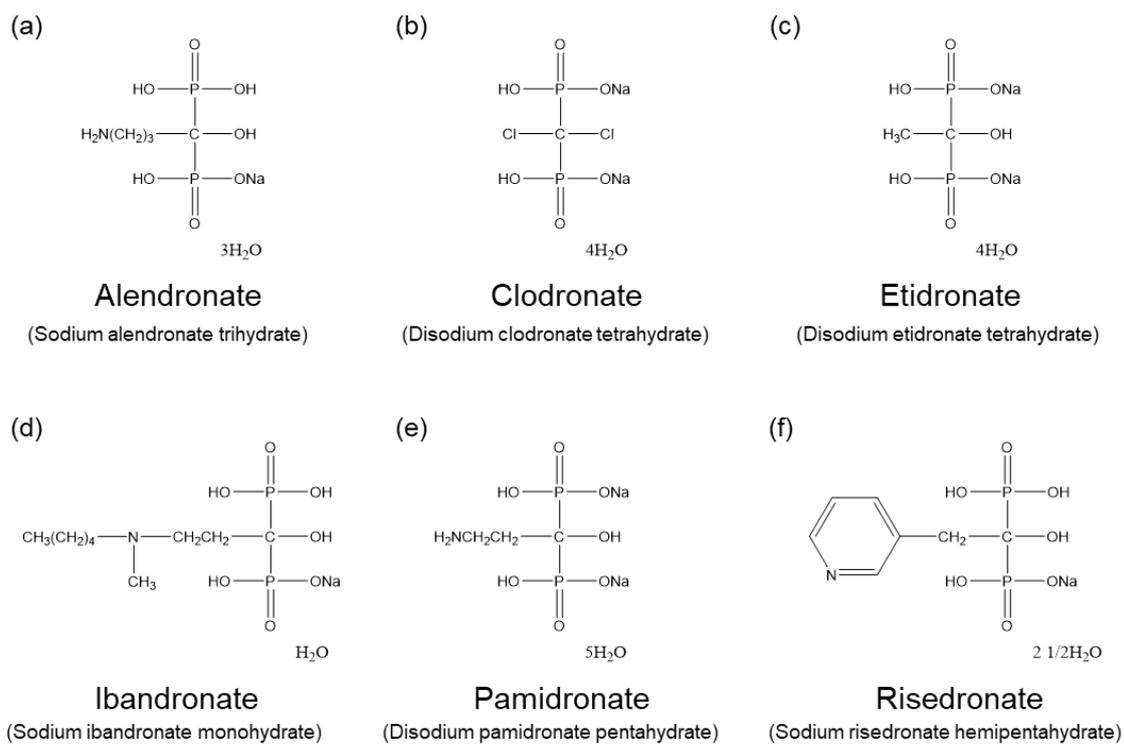


Figure 16. Chemical structure of bisphosphonates. (a) Alendronate, (b) clodronate, (c) etidronate, (d) ibandronate, (e) pamidronate, and (f) risedronate.

第 2 節 実験材料および実験方法

2.1. 実験材料

非晶質のエチドロン酸二ナトリウムは住友ファーマから入手した。アレンドロン酸ナトリウム三水和物、クロドロン酸二ナトリウム四水和物、イバンドロン酸ナトリウム無水物、パミドロン酸二ナトリウム五水和物及びリセドロン酸ナトリウム 2.5 水和物は、東京化学工業から購入した。

2.2. 水和物結晶の粉末試料の調製

エチドロン酸二ナトリウムの四水和物結晶は、入手したエチドロン酸二ナトリウムを恒温恒湿庫 LH33-12M(ナガノサイエンス)に 40°C90%RH で 7 日間保管することにより調製した。

イバンドロン酸ナトリウムの一水和物結晶は再結晶により調製した。購入したイバンドロン酸ナトリウム無水物約 100 mg を 2 mL の水に室温で完全に溶解し、貧溶媒としてエタノールを 8 mL 加えて密封し、室温で一晩静置した。析出したイバンドロン酸ナトリウム一水和物結晶をろ過回収し、室温減圧下で一晩乾燥した。

その他のビスホスホネートの水和物結晶は購入品を使用した。

2.3. X 線粉末回折測定

以下の測定は、Cu K α X 線、電流 40 mA、電圧 45 kV の条件で、Empyrean (PANalytical) を用いて実施した。

XRPD 測定は室温で、回折角 4–40°(2 θ)、ステップサイズ 0.017°、スキャンスピード 0.033°/秒で測定した。

2.4. 単結晶 X 線構造解析

アレンドロン酸ナトリウム三水和物、クロドロン酸二ナトリウム四水和物及びパミドロン酸二ナトリウム五水和物について、構造解析に適した単結晶を再結晶法により調製した。

アレンドロン酸ナトリウム三水和物約 20 mg を水/メタノール(3/1) 1 mL に 80°C で溶解した。この溶液を密封し、室温で 2 日間静置したところ、溶液中に立方形の単結晶が認められた。

クロドロン酸二ナトリウム四水和物約 20 mg を水/メタノール(1/1) 1 mL に 80°C で溶

解した。この溶液を密封し、室温で 2 日間静置したところ、溶液中に板状の単結晶が認められた。

パミドロン酸二ナトリウム五水和物約 20 mg を水 0.3 mL に 80°C で溶解した後、貧溶媒として水/メタノール(1/1) 0.3 mL を加えた。この溶液を密封し、室温で 2 日間静置したところ、溶液中に板状の単結晶が認められた。

これらのビスホスホネートの結晶構造は既に報告されているが(32–34)、高分解能の X 線回折データを用いて、単結晶の構造決定と精密化を行い、座標精度を改善した。単結晶 X 線回折測定は、Rigaku XtaLAB P200 (リガク)を用いて、Mo K α X 線、測定温度 93 K で測定した。構造決定は SHELXT (18)、SHELXL (19)、ShelXle (20)を用いた。結晶構造データは、Cambridge Structural Database に登録した。ビスホスホネートの結晶構造データを Table 5 に示す。また、エチドロン酸二ナトリウム四水和物(CCDC 番号 2097632)、イバンドロン酸ナトリウム一水和物(CCDC 番号 729728)及びリセドロン酸ナトリウム 2.5 水和物(CCDC 番号 205288)の結晶構造データを用い、XANES スペクトルとの関係性を調べた。

Table 5 Crystallographic data of each single crystal for bisphosphonate hydrates.

Sample	Alendronate	Clodronate	Etidronate	Ibandronate	Pamidronate	Risedronate
CCDC ID	2314300	2314301	2097632	792728	2314302	205288
Reference	This study	This study	This study	4	This study	35
Chemical formula	$C_4H_{12}NO_7P_2 \cdot Na \cdot 3(H_2O)$	$CH_2Cl_2O_6P_2 \cdot Na_2 \cdot 4(H_2O)$	$C_2H_6O_7P_2 \cdot Na_2 \cdot 4(H_2O)$	$C_9H_{22}NO_7P_2 \cdot Na \cdot H_2O$	$C_3H_9NO_7P_2 \cdot Na_2 \cdot 5(H_2O)$	$C_7H_{10}NO_7P_2 \cdot Na \cdot 2.5(H_2O)$
Space group	$P2_1/n$	$P1$	$P2_1/c$	$P1$	$P1$	$C2/c$
Cell parameters (\AA , $^\circ$)						
<i>a</i>	7.26445(9)	5.88392(15)	10.5176(2)	5.9730(10)	5.93440(10)	21.664(7)
<i>b</i>	8.95664(11)	9.1425(3)	5.97018(13)	9.1930(10)	10.8658(4)	8.930(3)
<i>c</i>	19.4137(2)	11.2028(3)	18.1576(4)	14.830(2)	11.2371(4)	15.123(5)
α	90	89.347(2)	90	98.221(2)	113.845(4)	90
β	100.3271(12)	87.389(2)	92.086(2)	98.974(2)	93.032(2)	114.692(5)
γ	90	88.567(2)	90	93.743(2)	92.129(2)	15.123(5)
Cell volume (\AA^3)	1242.69	601.795	1139.4	792.877	660.453	2658.18
Temperature (K)	93	93	93	93	93	93
Diffraction data						
Wavelength	Mo $K\alpha$	Mo $K\alpha$			Mo $K\alpha$	
No. of reflections						
Measured	41251	51273			76132	
Unique	4039	4389			4667	
$(\sin\theta/\lambda)_{\max}$	0.742	0.769			0.759	
R_{int}	0.0188	0.0832			0.0222	
Refinement						
R [$F^2 > 4\sigma(F^2)$]	0.0217	0.0333			0.0194	
$wR(F^2)$	0.1178	0.1069			0.1052	
Goodness-of-fit	1.130	0.812			1.0091	
$\Delta\rho_{\max}, \Delta\rho_{\min}$ ($e/\text{\AA}^3$)	0.50, -0.48	0.88, -0.59			0.52, -0.40	

2.5. XANES スペクトル測定

あいちシンクロトロン光センター(愛知県瀬戸市)の BL6N1 ビームラインで XANES スペクトルを測定した。試料を、導電性両面二重カーボンテープに載せ、XANES チャンバーにセットした。測定温度 25°C のヘリウム雰囲気下、 K_2SO_4 の S-K 吸収端のピークトップが 2481.7 eV になるように X 線エネルギーを校正した。XANES スペクトルは全電子収率モードで測定し、ATHENA ソフトウェア(21)を用いて XANES スペクトルのデータ処理を行い、XANES スペクトルにおける吸収端の前後で吸光度の差が 1 になるように規格化した。

第3節 結果及び考察

3.1. X線粉末回折測定

本研究で使用したビスホスホネートの水和物結晶について、XRPDの実測プロファイルは結晶構造から算出したプロファイルと一致しており(Fig. 17)、ビスホスホネート結晶が問題なく調製されていることが明らかとなった。

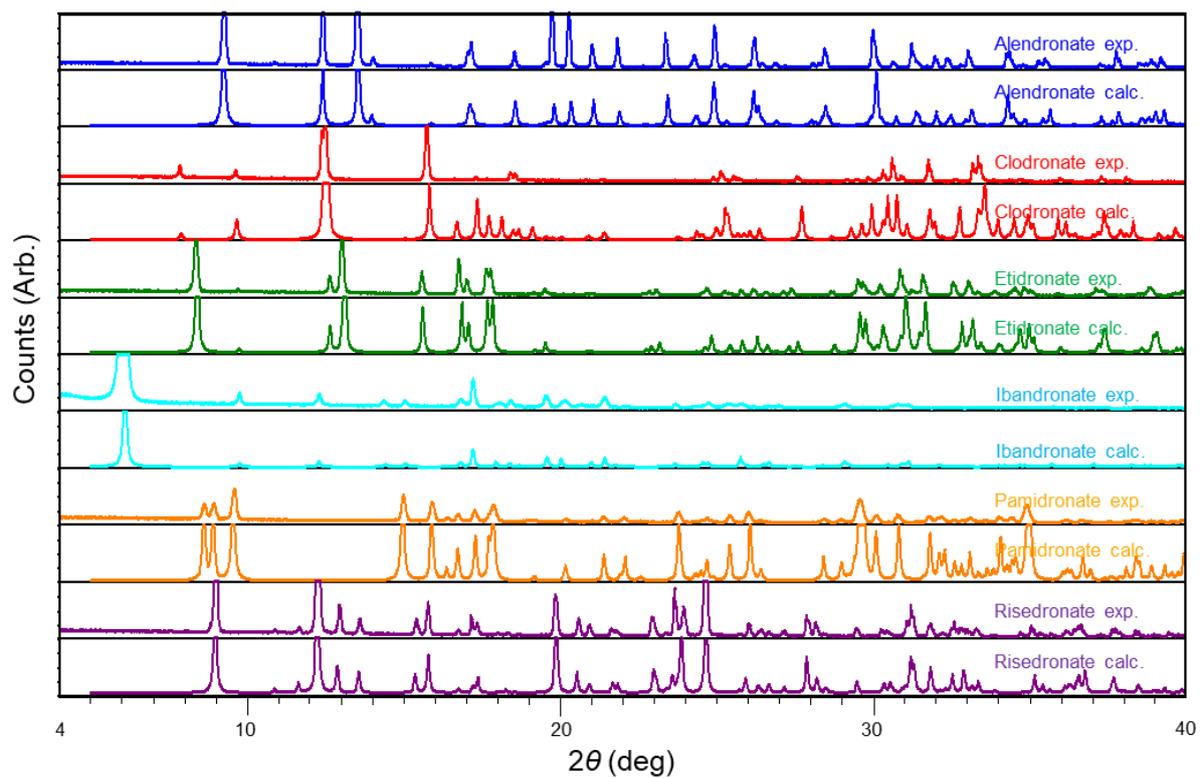


Figure 17. XRPD patterns of bisphosphonates. Exp. represents experimental data. Calc. represents calculated patterns generated from the crystal structures.

3.2. 単結晶 X 線構造解析

ビスホスホネート中のリン酸基に関する相互作用を Table 6 に記載した。ビスホスホネートは、ナトリウムイオンとリン酸基との配位結合、水分子とリン酸基との水素結合及び塩基性の窒素原子とリン酸基との水素結合といった種々の相互作用を有していた。

Table 6-1 Coordination bonds and hydrogen bonds formed at the phosphate moieties - Alendronate

Alendronate Bond type	P(1) phosphate moiety		P(2) phosphate moiety	
	Atoms* ¹	Distance* ² (Å)	Atom* ¹	Distance* ² (Å)
Coordination bond	P=O(2) Na(1)	2.3279(7)	P-O(4)H Na(1)	2.5273(7)
	P=O(3) Na(1)	2.3505(6)	P=O(6) Na(1)	2.5687(7)
Hydrogen bond	P-O(1)H H ₂ O(W2')	2.9243(8)	P-O(4)H P=O(2')	2.5069(8)
	P-O(1)H P=O(6')	2.6038(8)	P=O(5) N ⁺ (1') H ₃	2.8454(8)
	P=O(2) P-O(4')H	2.5069(8)	P=O(5) H ₂ O(W1')	2.6730(8)
	P=O(3) N ⁺ (1') H ₃	2.8639(9)	P=O(5) H ₂ O(W3')	2.7245(8)
	P=O(3) H ₂ O(W1')	2.7525(7)	P=O(6) P-O(1')H	2.6038(8)

*1 Numbers of crystallographic symmetry-related atoms are marked with primes.

*2 Distances between O and Na atoms of coordination bonds, between O atoms of O-H...O hydrogen bonds and between N and O atoms of N-H...O hydrogen bonds with their standard errors of the last digits in parentheses.

Table 6-2 Coordination bonds and hydrogen bonds formed at the phosphate moieties - Clodronate

Clodronate Bond type	P(1) phosphate moiety		P(2) phosphate moiety	
	Atoms* ¹	Distance* ² (Å)	Atom* ¹	Distance* ² (Å)
Coordination bond	P=O(3) Na(1)	2.344(1)	P=O(5) Na(1)	2.319(1)
	P=O(2) Na(1')	2.405(1)	P=O(5) Na(2)	2.368(1)
			P=O(6) Na(1')	2.395(1)
			P=O(6) Na(2')	2.517(1)
			P=O(6) Na(2'')	2.400(1)
Hydrogen bond	P-O(1)H H ₂ O(W4)	2.607(1)	P-O(4)H H ₂ O(W2')	2.700 (2)
	P-O(1)H H ₂ O(W4')	2.870(1)		
	P=O(2) H ₂ O(W1')	2.881(1)		
	P=O(2) H ₂ O(W3')	2.858(1)		
	P=O(3) H ₂ O(W3')	2.867(1)		
	P=O(3) H ₂ O(W4')	2.692(2)		

*1 Numbers of crystallographic symmetry-related atoms are marked with primes.

*2 Distances between O and Na atoms of coordination bonds and between O atoms of O-H...O hydrogen bonds with their standard errors of the last digits in parentheses.

Table 6-3 Coordination bonds and hydrogen bonds formed at the phosphate moieties - Etidronate

Etidronate Bond type	P(1) phosphate moiety		P(2) phosphate moiety	
	Atoms* ¹	Distance* ² (Å)	Atom* ¹	Distance* ² (Å)
Coordination bond	P-O(1)H Na(1)	2.414(1)	P=O(5) Na(1)	2.442(1)
	P-O(1)H Na(2)	2.769(1)	P=O(5) Na(2)	2.386(1)
	P=O(2) Na(1')	2.353(1)	P=O(5) Na(2')	2.340(1)
			P=O(6) Na(1')	2.299(1)
Hydrogen bond	P-O(1)H P=O(2')	2.599(1)	P-O(4)H H ₂ O(10)	2.579(4), 2.606(4)
	P=O(2) P-O(1')H	2.599(1)	P-O(4)H H ₂ O(11')	2.934(6), 2.954(6)
	P=O(3) H ₂ O(8')	2.752(1)	P=O(6) H ₂ O(8')	2.795(1)
	P=O(3) H ₂ O(9')	2.910(7), 2.747(9)	P=O(6) H ₂ O(10')	2.714(5), 2.706(6)
	P=O(3) H ₂ O(11')	2.760(4), 2.739(6)		

*1 Numbers of crystallographic symmetry-related atoms are marked with primes.

*2 Distances between O and Na atoms of coordination bonds and between O atoms of O-H...O hydrogen bonds with their standard errors of the last digits in parentheses. In the cases of disordered water molecules, two distances are shown, with the conformers of occupancies 0.502 and 0.498.

Table 6-4 Coordination bonds and hydrogen bonds formed at the phosphate moieties - Ibandronate

Ibandronate Bond type	P(1) phosphate moiety		P(2) phosphate moiety	
	Atoms ^{*1}	Distance ^{*2} (Å)	Atom ^{*1}	Distance ^{*2} (Å)
Coordination bond	P-O(1)H Na(1')	2.352(4)	P=O(5) Na(1)	2.305(3)
	P=O(2) Na(1)	2.347(4)	P=O(6) Na(1')	2.457(4)
	P=O(2) Na(1')	2.410(4)		
Hydrogen bond	P-O(1)H P=O(6')	2.555(5)	P-O(4)H H ₂ O(W1')	2.690(6)
	P=O(3) N ⁺ (1') H ₃	2.689(5)	P=O(5) H ₂ O(W1)	2.654 (7)
	P=O(3) P-O(1')H	2.676(5)	P=O(6) P-O(1')H	2.555(5)

*1 Numbers of crystallographic symmetry-related atoms are marked with primes.

*2 Distances between O and Na atoms of coordination bonds, between O atoms of O-H...O hydrogen bonds and between N and O atoms of N-H...O hydrogen bonds with their standard errors of the last digits in parentheses. The numbering of oxygen atoms was adjusted to that of etidronate.

Table 6-5 Coordination bonds and hydrogen bonds formed at the phosphate moieties - Pamidronate

Pamidronate Bond type	P(1) phosphate moiety		P(2) phosphate moiety	
	Atoms ^{*1}	Distance ^{*2} (Å)	Atom ^{*1}	Distance ^{*2} (Å)
Coordination bond	P=O(1) Na(1)	2.2803(5)	P-O(4)H Na(2')	2.4408(6)
	P=O(2) Na(1')	2.3722(6)	P=O(5) Na(1)	2.3759(6)
			P=O(5) Na(2)	2.2663(6)
			P=O(6) Na(1')	2.3757(6)
Hydrogen bond	P=O(1) N ⁺ (1') H ₃	2.7984(7)	P-O(4)H H ₂ O(W4')	2.7835(7)
	P=O(1) H ₂ O(W2)	2.6911(8)	P=O(6) H ₂ O(W4')	2.7097(8)
	P=O(2) H ₂ O(W1')	2.7897(9)	P=O(6) H ₂ O(W4'')	2.8252(6)
	P=O(2) H ₂ O(W2)	2.8787(7)		
	P=O(3) N ⁺ (1') H ₃	2.7422(8)		
	P=O(3) C-O(7')H	2.6948(7)		
P=O(3) H ₂ O(W3')	2.8186(8)			

*1 Numbers of crystallographic symmetry-related atoms are marked with primes.

*2 Distances between O and Na atoms of coordination bonds, between O atoms of O-H...O hydrogen bonds and between N and O atoms of N-H...O hydrogen bonds with their standard errors of the last digits in parentheses.

Table 6-6 Coordination bonds and hydrogen bonds formed at the phosphate moieties - Risedronate

Risedronate Bond type	P(1) phosphate moiety		P(2) phosphate moiety	
	Atoms ^{*1}	Distance ^{*2} (Å)	Atom ^{*1}	Distance ^{*2} (Å)
Coordination bond	P=O(3) Na(1)	2.4374(8), 2.764(1)	P=O(5) Na(1)	2.300(1), 2.289(1)
Hydrogen bond	P-O(1)H P=O(5')	2.5001(8)	P-O(4)H P=O(3')	2.654(1)
	P-O(1)H H ₂ O(9')	2.967(1), 2.922(2)	P=O(5) P-O(3')H	2.5001(8)
	P=O(2) N ⁺ (1') H ₃	2.644(1)	P=O(6) C-O(7')H	2.749(1)
	P=O(2) H ₂ O(10)	2.691(2), 2.910(2)	P=O(6) H ₂ O(8')	2.767(1), 2.757(2)
	P=O(3) P-O(4')H	2.654(1)		

*1 Numbers of crystallographic symmetry-related atoms are marked with primes.

*2 Distances between O and Na atoms of coordination bonds, between O atoms of O-H...O hydrogen bonds and between N and O atoms of N-H...O hydrogen bonds with their standard errors of the last digits in parentheses. In the cases of disordered sodium molecule or water molecules, two distances are shown, with the conformers of occupancies 0.5295 and 0.4705.

The numbering of oxygen atoms was adjusted to that of etidronate.

リン酸基の電荷に関して、アレンドロネート、クロドロネート、エチドロネート、イバンドロネート、リセドロネートは-1の電荷を持つリン酸基を2つ有していたが、パミドロネートは-1の電荷を持つリン酸基と-2の電荷を持つリン酸基を1つずつ有していた(Table 7)。また、リン酸基のリン原子-酸素原子(P-O)の結合距離については、負電荷の局在がビスホスホネートの間で異なっていた(Fig. 18)。アレンドロネート、クロドロネート、エチドロネート、リセドロネートに関して、-1の電荷を持つリン酸基のいずれについても、プロトン化されていない酸素原子のP-Oの距離は同等であり(1.489–1.517 Åの範囲)、同じリン酸基の2つのP-Oの距離の差は0.000–0.013 Åの範囲であった。これらの結果は、各リン酸基の負電荷が2つの酸素原子上に非局在化していることを示唆している。

イバンドロネートについて、P(2)のリン酸基のプロトン化されていない酸素原子2つのP-Oの距離はアレンドロネートや他のビスホスホネートと同等であり、P(2)のリン酸基の負電荷が2つの酸素上で非局在化していることが示唆された。一方、P(1)のリン酸基のプロトン化されていない酸素原子2つのP-Oの距離は異なっており、P(1)-O(2)の距離は1.487 Åであり、P(1)-O(3)の1.517 Åよりも0.030 Å短く、それぞれ二重結合と単結合となっており、負電荷がO(3)に局在化していることが示唆された。P(1)-O(2)の結合においてO(2)原子はsp²混成軌道を有し、ナトリウムイオンとの2つの配位結合による平面三角形構造によって安定化されている可能性が考えられた(Fig. 18d)。

パミドロネートについて、-1の電荷を持つP(2)のリン酸基は異なるP-O距離を示した(Table 7)。P(2)-O(5)の距離は1.495 Åであり、P(2)-O(6)の1.515 Åよりも0.020 Å短くなっており、O(5)原子は平面三角形構造でナトリウムイオンと2つの配位結合を形成していた(Fig. 18e)。以上から、イバンドロネートのP(1)のリン酸基と同様に、P(2)-O(5)の結合が二重結合となっており、負電荷がO(6)に局在化していることが示唆された。一方、-2の電荷を持つP(1)のリン酸基は、プロトン化された酸素原子を持たず、3つのP-Oの結合を有しており、その距離は1.521–1.542 Åであった(Table 7)。P(1)のリン酸基の各酸素原子は、合計3つの水素結合又は配位結合による四面体構造を形成しており(Fig. 17e)、P(1)のリン酸基における-2の負電荷が3つの酸素原子上に非局在化していることが示唆された。

Table 7 Electric charges and distances for phosphate moieties

Distance* ¹ (Å)		Alendronate	Clodronate	Etidronate	Ibandronate	Pamidronate	Risedronate
P(1) phosphate moiety	Electric charges	-1	-1	-1	-1	-2	-1
	P(1)- O(1)H * ²	1.583(1)	1.584(1)	1.588(1)	1.566(4)	1.527(1)	1.566(1)
	P(1)-O(2)	1.517(1)	1.499(1)	1.513(1)	1.487(3)	1.521(1)	1.510(1)
	P(1)-O(3)	1.513(1)	1.504(1)	1.505(1)	1.517(3)	1.542(1)	1.510(1)
P(2) phosphate moiety	Electric charges	-1	-1	-1	-1	-1	-1
	P(2)- O(4)H	1.578(1)	1.579(1)	1.580(1)	1.584(3)	1.612(1)	1.581(1)
	P(2)-O(5)	1.511(1)	1.489(1)	1.507(1)	1.494(3)	1.495(1)	1.509(1)
	P(2)-O(6)	1.504(1)	1.502(1)	1.510(1)	1.497(3)	1.515(1)	1.498(1)
The difference between P(1)-O(2) and P(1)-O(3)		0.004	0.005	0.008	0.030	0.021	0.000
The difference between P(2)-O(5) and P(2)-O(6)		0.007	0.013	0.003	0.003	0.020	0.011
The maximum difference between P(1)-O(1)H and; P(1)-O(2) or P(1)-O(3)		0.069	0.085	0.083	0.079	0.016	0.056
The maximum difference between P(2)-O(4)H and; P(2)-O(5) or P(2)-O(6)		0.075	0.090	0.073	0.090	0.117	0.083

*1 Distances between P and O atoms of phosphate moieties with their standard errors of the last digits in parentheses.

*2 The pamidronate is P(1)-O(1)
The numbering of oxygen atoms was adjusted to that of etidronate.

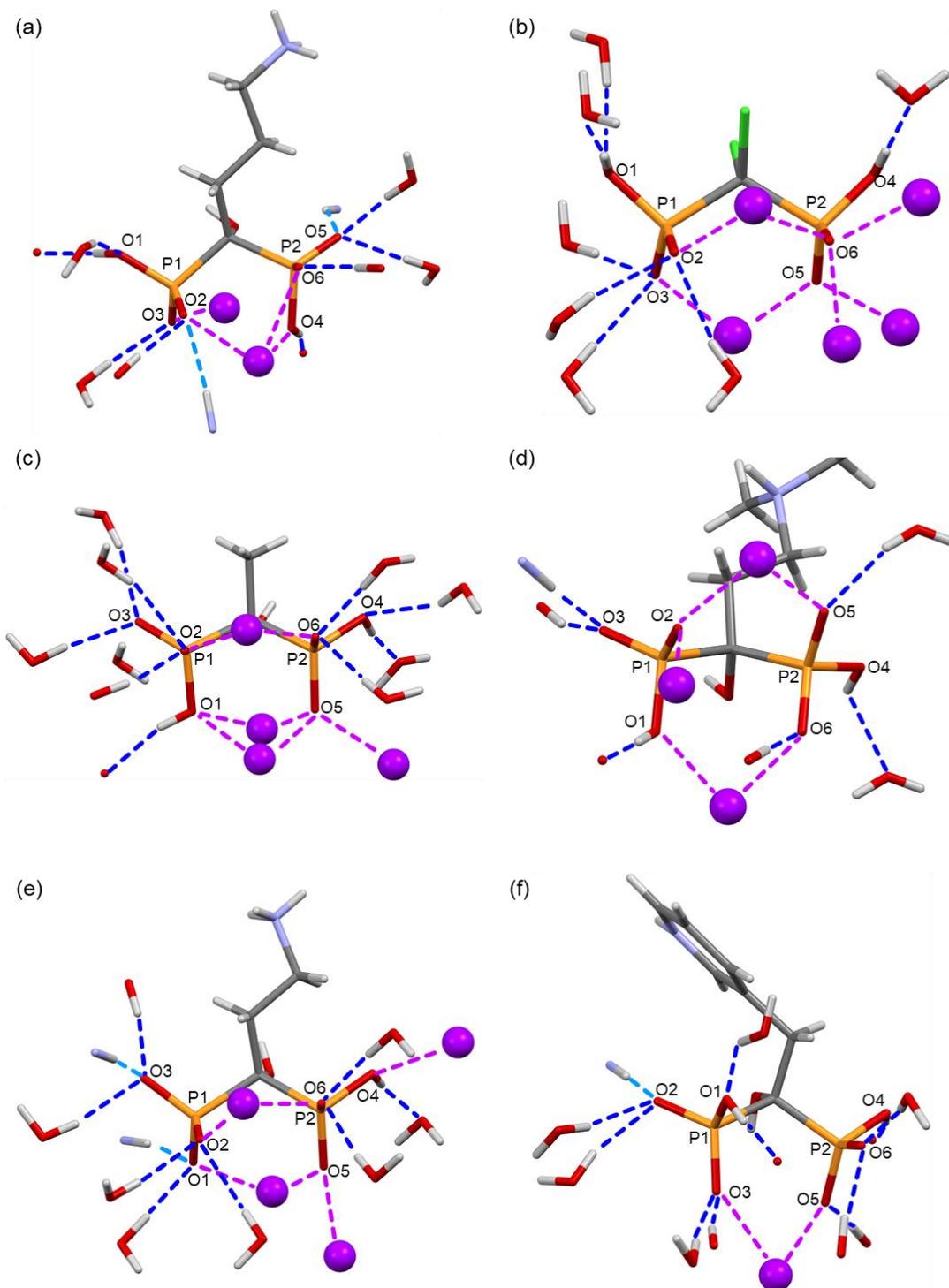


Figure 18. Coordination bonds and hydrogen bonds formed at the phosphonate moieties of bisphosphonates. (a) Alendronate, (b) clodronate, (c) etidronate, (d) ibandronate, (e) pamidronate, and (f) risedronate. H, C, N, O, P, and Cl atoms are shown in white, gray, dull blue, red, orange, and light green, respectively. Na ions are shown as purple spheres. Hydrogen bonds between O atoms are indicated by blue dashed lines and those between O and N atoms are indicated by sky blue dashed lines. Coordination bonds are indicated by purple dashed lines. The numbering of oxygen atoms was adjusted to that of etidronate.

3.3. XANES スペクトル測定

ビスホスホネートの P-K 吸収端 XANES スペクトルにおいて、2150–2152 eV 付近で最大ピーク、2153–2185 eV の範囲で複数の小さなピークが認められた(Fig. 19a)。スペクトルの形状は各ビスホスホネートでそれぞれ固有であり、各ビスホスホネート原薬を XANES スペクトルに基づいて判別できることが示された。

クロドロネートのスペクトルは他のビスホスホネートと比べて顕著に異なっていた。クロドロネートの 2152 eV の最大ピークと 2169 eV のピークの吸光度とエネルギー値はビスホスホネートの中で最も高く、2155 eV でのピークについても吸光度はビスホスホネートの中で最も高かった(Fig. 19b, c)。また、2158 eV と 2162 eV の小さなピークがクロドロネートのみ認められた。以上のようなクロドロネートの顕著な差は、化学構造に由来する可能性がある。ビスホスホネートの中で、クロドロネートのみ 2 つの塩素原子を有しているが、塩素原子は電気陰性度が高く、電子求引効果が強い。クロドロネートの塩素原子はリン原子に直接結合していないが、隣接する炭素原子に結合しており、塩素原子の電子求引効果によってリン原子の電子密度が低下することが推測される。このように、塩素原子がリン原子の電子状態に影響を及ぼすことで、塩素原子のない他のビスホスホネートと比較してクロドロネートのスペクトルが有意に異なっていた可能性が考えられる。また、リン原子の電子密度が減少すると、リン原子の原子核の影響が強くなり、電子が原子核に強く引きつけられると推測される。その結果、電子の励起エネルギー(X 線吸収エネルギー)が大きくなり、ピークトップのエネルギーが高エネルギー側にシフトする可能性があり、クロドロネートの最大ピークのピークトップのエネルギー値が高くなった可能性が考えられた。

クロドロネート以外のビスホスホネート 5 種の化学構造は、リン酸基とは単結合の 3 つ分以上離れた箇所での差であるため(Fig. 16)、XANES スペクトルの差異は化学構造ではなく、リン酸基の相互作用や電荷状態の差異に起因すると考えられる。これら 5 種のビスホスホネートは、Table S1 に示すとおり様々な相互作用を有しており、リン原子の電子密度についても差異が生じていると考えられる。しかし、XANES スペクトルにおいて、クロドロネートのように明確なピークシフトは認められず、これらの相互作用が XANES スペクトルのエネルギー値に対して与える影響は小さいと推測された。

ビスホスホネートのスペクトルの最大ピークのピークトップは、幅広く平坦となっていた(Fig. 19b)。特に、アレンドロネート、エチドロネート、リセドロネートのピーク

クトップは二峰性を示した。これらのビスホスホネートは結晶中に異なる相互作用を形成する2つのリン酸基を含んでおり、各ビスホスホネートのスペクトルは2つのリン酸基のスペクトルが平均化されたことにより、二峰性となった可能性が考えられた。一方、クロドロネートのスペクトルはほぼ一峰性を示した。クロドロネートの2つのリン酸基の相互作用は異なっていたが、電気陰性度の高い塩素原子を持つクロドロネートの場合、2つのリン酸基の吸光度とエネルギー値に差が生じにくく、結果として一峰性のスペクトルとして観察された可能性が考えられた。

XANES スペクトルの吸光度は、X 線による電子励起と遷移の確率に依存し、その確率は電子軌道の形状に依存する。Table S1 のとおり、ビスホスホネートには様々な相互作用があるため、これらの相互作用によってリン原子の電子軌道の形状が変化し、吸光度も変化したと考えられた。

パミドロネートの最大ピークは、ビスホスホネートの中で最も低く、平坦となっていた(Fig. 19b)。前述のとおり、パミドロネートは-2 と-1 の電荷のリン酸基を有していたが、他のビスホスホネートは-1 の電荷のリン酸基のみであった(Table 7)。試料の電子状態によって、XANES スペクトルが変化することが知られている(36)。パミドロネート中の2つのリン原子間の電子状態の差は他のビスホスホネートと比べて大きくなることから、2つのリン原子のスペクトルの差も大きくなると推測される。スペクトルの差が大きくなることでスペクトルの重なりが減り、パミドロネートの最大ピークの高さが低く、平坦となった可能性が考えられる。

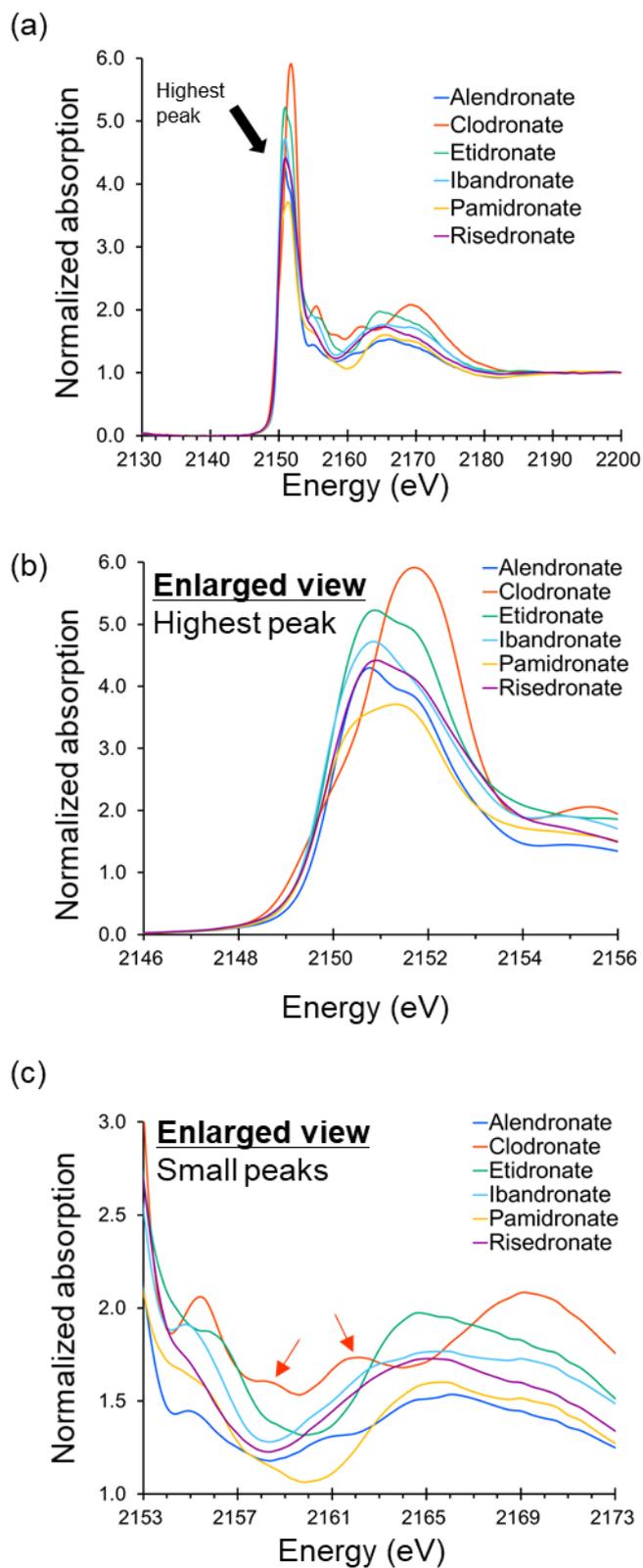


Figure 19. Phosphorus K-edge XANES spectra of bisphosphonates. (a) Overall view. (b) Enlarged view around highest peak. (c) Enlarged view around small peaks.

クロドロネートとパミドロネート以外のビスホスホネートにおける二峰性のピーク形状について、低エネルギー側のピーク(2151.0 eV)の吸光度は高エネルギー側のショルダーピーク(2151.5 eV 付近)より高かった。この傾向は、最大ピークのピークトップのエネルギー値に対する 2151.0 eV /2151.5 eV での吸収比のプロットからも明らかとなった(Fig. 20)。このプロット図では、-1 の電荷のみを有するビスホスホネートは、-2 と-1 の電荷のリン酸基を有するパミドロネートや 2 つの塩素原子を持つクロドロネートとは異なる領域にクラスター化された。-1 の電荷のみを有するビスホスホネートの中で、イバンドロネートでは最も明確にショルダーピークが認められており、プロット図においても最も高い吸収比を示している。前述のとおり、1 つの酸素原子では、P(1)のリン酸基の電荷が 1 つの酸素原子に局在化していると推定され、この影響により、イバンドロネートの特徴的なショルダーピークやプロット図の吸収比となった可能性が考えられる。

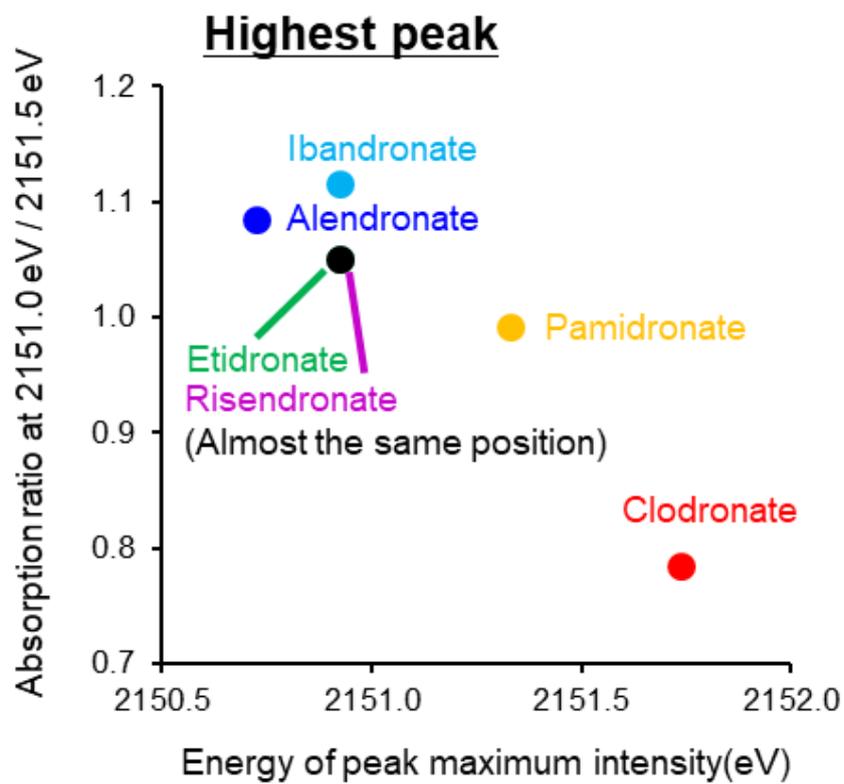


Figure 20. Plot of absorption ratio at 2151.0 eV / 2151.5 eV against highest peak top energy.

以上のとおり、ビスホスホネートの間で P-K 吸収端 XANES スペクトルの差異が認められ、特に、塩素原子の結合とリン酸基の電荷は XANES スペクトルにおけるピーク形状に大きく影響を与えると推測された。P-K 吸収端 XANES スペクトル測定法は、リン酸基の電荷数の評価に特に有用であると考えられる。さらに、XANES スペクトルの形状は、リン酸基における負電荷の局在化、塩基性の窒素原子とリン酸基との水素結合、ナトリウムイオンとリン酸基との配位結合、及び水分子とリン酸基との水素結合を含む様々な要素の影響を受けると考えられた。また、リン酸基の酸素原子における相互作用の違いが、各化合物がそのスペクトルにより区別できるレベルで XANES スペクトルのピーク形状を変化させることが示され、P-K 吸収端 XANES スペクトル測定法がリン酸基を含む医薬品原薬の評価に有用であると考えられた。さらに、リン酸基と類似の化学的性質及び構造であるスルホン酸基を含む医薬品原薬は数多くあるため、S-K 吸収端 XANES スペクトル測定法についても、医薬品の研究に有用である可能性があり、今後の研究が期待される。

第4節 小括

6種のビスホスホネートの水和物結晶を用いて、P-K吸収端XANESスペクトルがどのようにリン酸基の原子間相互作用と荷電状態に影響されるかを調査した。その結果、塩素原子への結合、リン酸基の電荷数、リン酸基の酸素原子での相互作用の違いがXANESスペクトルのピーク形状に影響すると考えられた。原子間相互作用と荷電状態のわずかな差がスペクトルの種々の差として反映されることから、XANESスペクトル測定法は医薬品原薬の判別手法として幅広く適用可能であると考えられた。

総括

本研究においては XANES スペクトル測定法を含む種々の手法によりエチドロン酸二ナトリウムの物性評価を行った。

第 1 章では、XANES スペクトル測定法を含む種々の手法を用いて、エチドロン酸二ナトリウムの四水和物結晶の物性の詳細を評価した。XRPD 測定と熱測定の結果から、Form I は加熱により脱水を伴いながら非晶質化し、更なる加熱により無水物結晶である Form II への結晶化を経て、最終的に Form III に転移することが明らかとなった。DVS 測定において、室温では 60–80%RH で Form II、Form III、非晶質が吸湿して Form I を形成したが、湿度を 0%RH に下げても Form I は安定であったことから、Form I が通常的环境下で最安定形であり、エチドロン酸二ナトリウムの固形製剤の製造における原薬形態として適していると考えられた。Form I 以外を原薬形態として選択する場合、原薬及び製剤の保管は湿度管理が必要である。P-K 吸収端 XANES スペクトル測定の結果、Form I、Form II 及び非晶質の間で異なるスペクトルが得られ、P-K 吸収端 XANES スペクトル測定法により、リン酸基を含む原薬の結晶形の同定又は判別が可能であることが初めて実証された。

第 2 章では、エチドロン酸二ナトリウムの非晶質に着目し、非晶質の製法が及ぼす物性への影響について詳細を評価した。昇温 XRPD 測定と熱測定の結果、 T_g 、脱水、結晶化温度などの物性の点で非晶質 H、A、F 間の差異が認められたが、これらの違いは、非晶質の水分量と分子運動性の違いから生じている可能性がある。物性の差異に関連する構造的な特徴の差異は、ラマンスペクトル測定や XANES スペクトル測定のような分光学的な手法では詳細を明らかにすることができなかった。DVS 測定の結果、非晶質はいずれも 50%RH 以上で非晶質から Form I に不可逆的に転移することが確認され、これらの非晶質を保存する際は、結晶化を避けるために湿度を厳密に制御する必要があると考えられた。3 つの非晶質のうち、水分量は非晶質 H が最も低く、非晶質 H のみが局方で規定される水分量の品質規格（5.0%以下）を満たしている点、分子運動性が低く、保存中の結晶化リスクも最も低いと考えられる点を踏まえ、非晶質 H が固形製剤の製造に最適であると考えられた。

第 3 章では、エチドロン酸二ナトリウムを含むビスホスホネート系原薬 6 種の XANES スペクトルを測定し、原薬の X 線吸収原子の相互作用が XANES スペクトル形状に与える影響を解析した。その結果、塩素原子への結合、リン酸基の電荷数、リン酸基の酸素原子での相互作用の違いが XANES スペクトルのピーク形状に影響する

と考えられた。原子間相互作用と荷電状態のわずかな差がスペクトルの種々の差として反映されることから、XANES スペクトル測定法は医薬品原薬の判別手法として幅広く適用可能であると考えられた。

以上のエチドロロン酸二ナトリウムの物性に関する知見は、エチドロロン酸二ナトリウムの固形製剤の製造にとって非常に重要である。また、XANES スペクトル測定法は、原薬の物性評価や判別手法として適用可能と考えられ、原薬及び製剤の品質評価手法において有用と期待される。

謝辞

本研究に際し、ご指導、ご鞭撻を賜り、かつ本稿をご校閲いただきました東邦大学薬学部 野口修治教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究をまとめるにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました東邦大学薬学部 鈴木浩典准教授、伊藤雅隆講師に深く感謝いたします。

本研究の機会を与えていただき、終始ご指導、ご助言いただきました、元大日本住友製薬株式会社分析研究所 橋塚貴彦氏に深く感謝いたします。

最後に、本研究の遂行中及び論文執筆中にお世話になった方々、いつも自分を支えてくれた妻と息子達に心より感謝いたします。

2024年9月

伊藤 直也

論文目録

- 1) Ito, N.; Hashizuka, T.; Ito, M.; Suzuki, H.; Noguchi, S. Investigation of physical properties of disodium etidronate tetrahydrate and application of phosphorus K-edge X-ray absorption near-edge structure spectroscopy. *Pharm. Res.* 2021, 38, 2147–2155.
- 2) Ito, N.; Hashizuka, T.; Ito, M.; Suzuki, H.; Noguchi, S. Comparison of the physical properties of disodium etidronate amorphous forms prepared by different manufacturing methods. *Int. J. Pharm.* 2023, 635, 122723.
- 3) Ito, N.; Ito, M.; Suzuki, H.; Noguchi, S. Characterization of bisphosphonate hydrate crystals by phosphorus K-edge X-ray absorption near-edge structure spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.* 2024, 72, 480–486.

参考文献

- 1) Watts, N.B.; Chesnut III, H.C.; Genant, S.T.; Harris, S.T.; Jackson, R.D.; Licata, A.A.; Miller, P.D.; Mysiw, W.J.; Richmond, B.; Valent, D. History of etidronate. *Bone* 2020, 134, 115222.
- 2) Asnani M.; Vyas K.; Bhattacharya, A.; Devarakonda, S.; Chakraborty, S.; Mukherjee, A. K. Ab initio structure determination of anhydrous sodium alendronate from laboratory powder X-ray diffraction data. *J. Pharm. Sci.* 2009, 98, 2113–2121.
- 3) Gonzaga, E. V.; Viana, A. L. M.; Viana, O. M. M. S.; Doriguetto, A. C. Solid-state phase transition mechanism and physical–chemical study of the crystal forms of monosodium alendronate: trihydrate versus anhydrate. *Cryst. Growth Des.* 2016, 16, 6891–6902.
- 4) Malpezzi, L.; Maccaroni, E.; Carcano, G.; Ventimiglia, G. Structural and thermal characterization of sodium ibandronate monohydrate. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2012, 109, 373–379.
- 5) Bruning, J.; Petereit, A. C.; Alig, E.; Bolte, M.; Dressman, J. B.; Schmidt, M. U. Characterization of a new solvate of risedronate. *J. Pharm. Sci.* 2011, 100, 863–873.
- 6) Ito, M.; Shiba, R.; Watanabe, M.; Iwao, Y.; Itai, S.; Noguchi, S. Phase transitions of antibiotic clarithromycin forms I, IV and new form VII crystals. *Int. J. Pharm.* 2018, 547, 258–264.
- 7) Thakral, S.; Suryanarayanan, R. Salt formation during freeze-drying – an approach to enhance indomethacin dissolution. *Pharm. Res.* 2015, 32, 3722–3731.
- 8) Gaur, A.; Shrivastava, B. D.; Nigam, H. L. X-ray absorption fine structure (XAFS) spectroscopy - a review. *Proc. Indian. Natl. Sci. Acad. B. Biol. Sci.* 2013, 79, 921–966.
- 9) Huang, Z.; Suzuki, H.; Ito, M.; Noguchi, S. Direct detection of the crystal form of an active pharmaceutical ingredient in tablets by X-ray absorption fine structure spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 2023, 625, 122057.
- 10) Suzuki, H.; Iwata, M.; Ito, M.; Noguchi, S. X-ray absorption near edge spectroscopy analysis of indomethacin in crystalline forms and in amorphous solid dispersions. *Mol. Pharm.* 2021, 18, 3475–3483.
- 11) Ito, M.; Suzuki, H.; Noguchi, S. Chlorine K-edge X-ray absorption near-edge structure discrimination of crystalline solvates and salts in organic molecules. *Cryst. Growth Des.* 2020, 20, 4892–4897.

- 12) Ito, M.; Shiba, R.; Suzuki, H.; Noguchi, S. Chlorine K-edge X-ray absorption near-edge structure analysis of clarithromycin hydrochloride metastable crystal. *J. Pharm. Sci.* 2020, 109, 2095–2099.
- 13) Suzuki, H.; Tomita, A.; Ito, M.; Noguchi, S. Bromine K-edge X-ray absorption near-edge structure analysis on hydrobromide-salt crystals and the solid dispersion of active pharmaceutical ingredients. *Chem. Pharm. Bull.* 2022, 70, 182–186.
- 14) Huang, Z.; Suzuki, H.; Ito, M.; Noguchi, S. Characterization of ambroxol and its hydrochloride salt crystals by bromine K-edge X-ray absorption near-edge structure spectroscopy and X-ray crystal structure analysis. *Chem. Pharm. Bull.* 2022, 71, 741–746.
- 15) Suzuki, H.; Matsubara, D.; Nakata, Y.; Ito, M.; Noguchi, S. C–H•••S hydrogen bonds in ampicillin and amoxicillin crystals investigated by sulfur K-edge X-ray absorption near-edge structure spectroscopy and single-crystal X-ray structure analysis. *Chem. Pharm. Bull.* 2022, 70, 731–734.
- 16) Suzuki, H.; Matsushima, M.; Ito, M.; Noguchi, S. Analysis of cimetidine crystal polymorphs by X-ray absorption near-edge spectroscopy. *Mol. Pharm.* 2023, 20, 1213–1221.
- 17) Barnett, B. L.; Strickland, L.C. Structure of disodium dihydrogen 1-hydroxyethylidenediphosphate tetrahydrate: a bone growth regulator. *Acta Crystallogr.* 1979, B35, 1212–1214.
- 18) Sheldrick, G. M. SHELXT–Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr.* 2015, A71, 3–8.
- 19) Sheldrick, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr.* 2015, C71, 3–8.
- 20) Hübschle, C. B.; Sheldrick, G. M.; Dittrich, B. ShelXle: a Qt graphical user interface for SHELXL. *J. Appl. Crystallogr.* 2011, 44, 1281–1284.
- 21) Ravel, B.; Newville, M. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J. Synchrotron Radiat.* 2005, 12, 537–541.
- 22) Kennedy, A. R.; Okoth, M. O.; Sheen, D. B.; Sherwood, J. N.; Teat, S. J.; Vrcelj, R. M. Cephalixin: a channel hydrate. *Acta Crystallogr.* 2003, C59, o650–o652.
- 23) Stephenson, G. A.; Groleau, E. G.; Kleemann, W. X.; Rigsbee, D. R. Formation of isomorphic desolvates: Creating a molecular vacuum. *J. Pharm. Sci.* 1998, 87, 536–542.

- 24) United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopoeia 43th-National Formulary. 2020, 38, Stationery Office, USA.
- 25) Society of Japanese Pharmacopeia. Japanese Pharmacopeia, 18th ed. 2021, Pharmaceuticals and Medical devices Agency, Japan.
- 26) Hancock, B. C.; Zografi, G. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86, 1–12.
- 27) Li, Y.; Han, J.; Zhang, G. G. Z.; Grant, D. J. W.; Suryanarayanan, R. In situ dehydration of carbamazepine dihydrate: a novel technique to prepare amorphous anhydrous carbamazepine. *Pharm. Dev. Technol.* 2000, 5(2), 257–266.
- 28) Surana, R.; Pyne, A.; Suryanarayanan, R. Effect of preparation method on physical properties of amorphous trehalose. *Pharm. Res.* 2004, 21, 1167–1176.
- 29) Yu, L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, 48, 27–42.
- 30) Mehta, M.; Kothari, K.; Ragoonanan, V.; Suryanarayanan, R. Effect of water on molecular mobility and physical stability of amorphous pharmaceuticals. *Mol. Pharm.* 2016, 13, 1339–1346.
- 31) Taylor, L. S.; Langkilde, F. W.; Zografi, G. Fourier transform Raman spectroscopic study of the interaction of water vapor with amorphous polymers. *J. Pharm. Sci.* 2001, 90, 888–901.
- 32) Vega, D.; Baggio, R.; Garland, M. T. Monosodium 4-amino-a-hydroxy-1,1-butanedioldiphosphonate trihydrate (Alendronate). *Acta Crystallogr., Sect. C. Struct. Chem.* 1996, 52, 2198–2201.
- 33) Nardelli, M.; Pelizzi, G. A structural study on metal binding of gem-diphosphonates, born growth regulators. *Inorganica Chim. Acta* 1983, 80, 259–271.
- 34) Vega, D.; Fernandez, D.; Ellena, J. A. Disodium pamidronate. *Acta Crystallogr., Sect. C. Struct. Chem.* 2002, C58, m77–m80.
- 35) Gossman, W. L.; Wilson, S. R.; Oldfield, E. Three hydrates of the bisphosphonate risedronate, consisting of one molecular and two ionic structures. *Acta Crystallor.* 2003, C59, m33–36.
- 36) Figueroa, S. J. A.; Requejo, F.G.; Ledesma, E. J.; Lamaita, L.; Peluso, M. A.; Sambeth, J. E.

XANES study of electronic and structural nature of Mn-sites in manganese oxides with catalytic properties. *Catal. Today*. 2005, 107–108, 849–855.