L- アスパラギン酸の冷却晶析に及ぼす超音波照射の影響

Effects of Ultrasound Irradiation on Cooling Crystallization Process of L-aspartic Acid

山本 辰美^{a*}, 川崎 博幸^a, 水野 光国^b, 森 英利^a

Tatsumi Yamamoto, Hiroyuki Kawasaki, Mitsukuni Mizuno, Hidetoshi Mori

Received 31 August 2013; Accepted 14 November 2013

An ultrasound (US) irradiation technique was applied to obtain the rod-like L-aspartic acid crystal in cooling crystallization process. In experiments, the 20 kHz horn-type transducer was installed vertically into the aqueous solution. Experimental results confirmed that arithmetic mean and ratio of breadth and length of a formed crystal can be reasonably controlled by US intensity and irradiation time. The high yield of rod-like crystals was obtained under the conditions of 46 W/cm² US intensity and 1 min irradiation time. SEM and XRD analysis demonstrated that all crystals formed in this study were plate like α -form, and that rod-like crystals formed by US irradiation were revealed to be the polysynthetic twin composed of small size plate-like crystals.

Keywords: Cooling crystallization, Ultrasound irradiation, L-aspartic acid, Polysynthetic twin

1. 緒 言

晶析操作は医薬品や化成品の製造工程における重要な分離精製法のひとつであり、結晶の多形や粒子径の制御は重要な要素技術になっている。特に医薬品製造分野では冷却晶析をよく用いるが、生成される結晶形は薬本来の薬効や結晶粉体のハンドリング特性に大きく影響を及ぼす。

例えば、一般に板状結晶は柱状結晶に比べ固液分離した際に結晶に付着残留する母液量が多いため、結晶への不純物の取り込みが多く、高純度の結晶を得ることができないので、晶析時の結晶粒子の形状としては板状よりも柱状が望まれている^{1, 2)}。医薬品や調味料などの原料として多様な用途をもつ重要なアミノ酸の

ひとつである L- アスパラギン酸を例にとれば、水溶液からの晶析で得られる結晶は通常板状の α 形結晶であるが、晶析条件を選べば柱状の β 形結晶となる。しかし、 β 形結晶は α 形に比べて低温域の溶解度が高く不安定である³⁾ ため、 α 形のままで柱状の結晶粒子を得る方法が望ましい。アスパラギン酸の α 形柱状結晶を得る方法としては、リンゴ酸共存下でアスパラギン酸アンモニウム水溶液に硫酸または塩酸を添加して pH を調整しながら晶析を行う方法¹⁾ が特許として出願公開されており、これは D- 体と L- 体のどちらにも対応し、特に L- 体で効果が著しいとされている。さらに、温度条件を適切にコントロールしながら L- アスパラギン酸アンモニウム水溶液にマレイン酸を添加して晶析する方法²⁾ も公開されているが、どちらの方法もアスパラギン酸塩以外の有機酸を適量添加する必要がある、最適操作条件の設定も煩雑である。

一方、晶析操作に超音波を利用する試みが、近年多く報告されるようになってきた。超音波を用いる晶析法としては、貧溶媒を添加して溶解度を下げる貧溶媒晶析への応用を検討している例^{4, 5)} もあるが、溶液を冷却して過飽和状態にする冷却晶析についての報告が多い⁶⁾。いずれの場合も、超音波照射により準安定域

^a 富山大学 工学部 生命工学科
(〒930-8555 富山市五福3190)

Department of Life Sciences and Bioengineering, Faculty of Engineering, University of Toyama
(3190 Gofuku, Toyama 930-8555, Japan)

^b 愛知工業大学 工学部 機械工学科
(〒470-0392 愛知県豊田市八草町八千草1247)

Department of Mechanical Engineering, Aichi Institute of Technology
(1247 Yachigusa, Yakusa-cho, Toyota, Aichi 470-0392, Japan)

* 責任著者連絡先 yamamoto@eng.u-toyama.ac.jp

の幅が減少し、核化の制御が容易になる利点を報告している例⁷⁾が多く、超音波による結晶多形の変化についての報告⁸⁾はまだ少ない。さらに超音波支援で連続操作を行った場合、より短時間で結晶粒子径分布が安定し、かつ凝集も減らせるという利点が報告⁹⁾されている。しかし、超音波照射が結晶形や結晶の粒子形状などに及ぼす影響については、未だ明確な傾向が見いだされていない。

本研究では、結晶形の制御が従来の方法ではプロセスが煩雑になる L- アスパラギン酸の晶析を採り上げ、超音波照射を併用して、より簡便に α 形結晶の柱状粒子を得る方法を検討した。

2. 実験方法

L- アスパラギン酸（関東化学，特級試薬）粉末を 25℃における飽和濃度の 2 倍の濃度となるように蒸留水 50 mL が入ったガラス製耐熱瓶（Duran，容積 100 mL）に加え，60℃の恒温水槽中で 2 時間マグネチックスターラー（540 rpm）を用いて攪拌し完全に溶解した。その溶液入りのガラス瓶を 25℃の恒温水槽に移し 25℃まで冷却した。60℃から 25℃になるまで 10 分間を要し，K 型熱電対により測定されたこの間の温度変化がほぼ直線的であることを確認しており，見かけの平均冷却速度は 3.5℃/min であった。その後，25℃に保ちつつ 20 kHz 超音波を所定時間（1, 5, 10, 15 min）照射した。超音波照射には超音波発生装置（BRANSON SONIFIER model450D）と 1/8 インチスタンダードタイプマイクロチップ付きタップ型ホーン（チップ先端部直径 3.2 mm）を用い，マイクロチップ先端を深さ 5 mm まで溶液に浸漬して超音波を照射した。超音波照射出力は 3 段階に変えたが，K 型熱電対と温度計測記録装置（グラフテック，midi LOGGER GL200）を用いた熱量法¹⁰⁾で測定した超音波出力は 13, 46, 67 W/cm² であった。照射後チップ先端を溶液から引き上げ，密閉後一定時間（1 時間，5 時間および 24 時間）恒温槽中に放置してから懸濁液を底部にグリッド付き箔ガラス板（12 mm 径）を配した 35 mm 径ガラスボトムディッシュ（岩城ガラス製）に採取し，懸濁結晶微粒子をできるだけ均一に分散後，位相差コンデンサー付倒立型光学顕微鏡（ニコン，TMD-1）で写真撮影し，結晶微粒子群の二軸平均径 $\{(長径+短径)/2\}$ と短長比（短径/長径）の度数分布を求めた。なお，一枚の写真に写った結晶は全て計測し，計測した結晶の総数は各回 200 個程度になるようにした。また，同じ条件で各 2 回の反復実験を行い，再現性を確

Fig. 1 Images of L-aspartic acid crystals at 24hr after ultrasound irradiation
(A) no irradiation
(B) 46 W/cm² ultrasound irradiation for one minute

認した。さらに照射 24 時間後の結晶懸濁液をペーパーフィルター（東洋濾紙，5 C）で濾過して得られた結晶粉末をデシケーター内で十分乾燥後，SEM（日立，Microscope TM1000 および TM3000）による形状観察，XRD（ブルカー AXS，D8 DISCOVER および島津，XRD-6100）による結晶相の同定に供した。

3. 結果および考察

3. 1 超音波照射とその後の放置時間による結晶粒子形状の変化

本研究では，先述の通り同じ条件で各 2 回の反復実験を行い，再現性を確認しているが，ここで示されるグラフは全て 2 回目の実験結果を示している。**Fig. 1** (A) には，25℃に保った恒温槽中に 24 時間放置した後の溶液中結晶粒子の光学顕微鏡写真を示した。超音波を照射しない場合には，この写真のような比較的大きな板状晶が多くみられた。これらの結晶粒子の二軸平均径と短長比の累積頻度分布の経時変化を **Fig. 2** に示す。二軸平均径は放置時間が長くなるにつれて大きくなっているが，短長軸比の分布には顕著な変化はみられない。一方，わずか 1 分間でも超音波を照射すると，**Fig. 1** (B) に示すように柱状晶の割合が非常に多くなり，**Fig. 3** に示すように，二軸平均径の分布幅と照射後の経時変化は照射強度に強く依存する傾向が

Fig. 2 Distributions of the size and the breadth/length ratio of L-aspartic acid crystals under the no irradiation condition

みられる。照射強度 13 W/cm^2 の場合には、24時間後の50%平均長がやや小さくなる程度で、Fig. 2の無照射の場合と比較して顕著な変化はみられない。一方、照射強度を 46 W/cm^2 とした場合には、50%平均長が小さいシャープな分布を有する傾向が1時間後に得られ、その後は徐々に成長する様子が見えてくる。さらに、照射強度を 67 W/cm^2 に上げると、1時間以降の平均長にはほとんど変化がみられない。Fig. 4には短長比の分布を示す。超音波を照射することによって短長比の小さな柱状粒子の割合が多くなる傾向がみられる。一方で、時間と共に短長比がわずかながら大きくなる傾向も確認でき、時間の経過に伴って柱状の結晶粒子が太くなってきている可能性も考えられる。しかし、超音波無照射の場合には、結晶の数が少なく溶液中の溶質濃度が超音波照射時よりも高いと考えられるにもかかわらず、このような傾向は見られないので、さらに検討の余地がある。また 46 W/cm^2 の場合に、他の照射強度の場合に比べて柱状の結晶粒子の割合が最も多くなる傾向がみられる。

3. 2 超音波照射条件による結晶粒子形状の変化

超音波照射後の放置時間を24時間に固定して、照射

Fig. 3 Time changes in the size distribution of L-aspartic acid crystals in the case of 1min ultrasound irradiation

強度と照射時間による結晶粒子形状の変化を調べた結果をFig. 5に示す。なお、図中には超音波を照射しない場合の分布を破線で示してある。一般に照射時間が長くなるのに伴って、二軸平均径は小さくなり、その変化も照射強度の影響を強く受けていることがわかる。ここで、 67 W/cm^2 の場合には、5分以上照射すると結晶粒子はかなり小さくなり、それ以上の照射時間による変化はほとんどみられない。また 46 W/cm^2 の場合には、1分間の照射によっても、他の強度の場合に比べてかなり結晶が小さくなり、Fig. 3の結果と同様に特徴的な傾向が現れている。短長比分布に及ぼす照射時間の影響をFig. 6に示す。図中には超音波を照射しない場合の分布も破線で示してある。どの照

Fig. 4 Time changes in the breadth/length ratio distribution of L-aspartic acid crystals in the case of 1 min ultrasound irradiation

射強度の場合も照射時間を長くすると短長軸比は大きくなり、柱状の結晶粒子の割合が減る傾向がみられるが、照射強度によって変化の傾向に違いがみられる。すなわち 13 W/cm^2 では、1～10分までは柱状晶の割合が多く、分布にはあまり変化がみられないが、15分になると短長比の値が大きく変化している。この場合には、Fig. 5 の二軸平均径分布はかなり小さい方に移行しており、短い照射時間で形成された柱状の結晶粒子が10分照射までは維持されていたが、15分間照射を続けることで、より短長比が大きい小さな粒子に変化したことを示唆している。 46 W/cm^2 では、照射時間が長くなるにつれて分布は短長比が大きな側に移行して柱状性が失われてきており、Fig. 5 の二軸平均径の

Fig. 5 Effects of ultrasound irradiation time on the size distribution of L-aspartic acid crystals after 24 h cooling crystallization

変化を考慮すれば、 13 W/cm^2 の場合に比べて短い結晶粒子への移行が速まっていると考えられる。 67 W/cm^2 の場合には、1分間照射で既に他の照射強度の場合に比べて短長比がやや大きい分布を呈しているが、照射時間が長くなるにつれて、さらに幅広い分布に移行していく傾向が見られた。以上の結果から、超音波強度および照射時間の制御により、二軸平均径および短長比を広範囲に変化させた柱状の結晶粒子が得られることが示された。

照射後24時間経過した結晶のX線回折パターン（銅陰極使用）をFig. 7およびFig. 8に示す。Fig. 7は照射時間を1分として照射強度の影響を、Fig. 8は照射強度を 46 W/cm^2 として照射時間の影響を示している。どの回折結果においても 2θ が 21.65° と 23.7°

Fig. 6 Effects of ultrasound irradiation time on the breadth/length ratio distribution of L-aspartic acid crystals after 24 h cooling crystallization

deg の位置に高いピーク強度が得られているが、これらのピークは各々(011)面と(200)面に対応しており(CAS No. 56-84-8)、本研究の実験条件下では、操作条件に依らず α 形結晶が得られていることが確認された。Fig. 7では、照射強度によって2つの相対的なピーク高さに変化がみられる。13 W/cm²と67 W/cm²では無照射の場合とほぼ一致していたが、46 W/cm²では(011)面に対応したピークの高さがかなり低くなっていた。一方、Fig. 8より、照射時間を長くすると(011)面および(200)面ともに回折強度が減少する傾向がみられる。

Kishishita ら¹¹⁾は、L-アスパラギン酸の板状晶では(200)面のピーク強度がb c面の乱れに対応して最も

Fig. 7 XRD patterns of L-aspartic acid crystals prepared under the ultrasound irradiation conditions

Fig. 8 Time changes in XRD patterns of L-aspartic acid crystals prepared under 46 W/cm² ultrasound irradiation conditions

強く、柱状晶では(011)面のピークが最も強く表れることを報告しており、そのL-アスパラギン酸柱状晶のパターンは結晶構造からシミュレートされるものに

Fig. 9 SEM image of a rod type crystal consisting polysynthetic twin, prepared under the 46 W/cm² ultrasound irradiation

一致している¹²⁾。ここでは、b c面の乱れを反映している(200)面の回折強度が相対的に強いことから、全ての照射条件で板状晶が形成されており、同時にb c面を接する双晶になりやすいことが推測させる。また、(200)面の回折強度が相対的に強くなっている結晶については、外形による選択配向ではなく、異方的な結晶組織の乱れによる選択配向であるとする解釈³⁾があり、超音波照射時のような高い駆動力下での核形成段階では、双晶核が形成される確率が高くなり¹³⁾、多数発生した微細な板状晶が成長段階に入る前に、この選択的配向によって互いにb c面を接する集片双晶を形成する可能性が考えられる。顕微鏡観察からは、特に46 W/cm²の場合に柱状粒子が多く得られているが、X線回折パターンでは明らかに板状晶の特徴が得られている。そこで、強度46 W/cm²で1分間照射し、その後24時間放置した結晶懸濁液から採取した結晶粒子をSEM(日立, TM3000)観察した結果をFig. 9に示した。光学顕微鏡による観察では柱状として観察されたものは、SEM撮影像により小さな板状結晶が積層した集片双晶であることが明らかとなった。この柱状の集片双晶粒子は、ミクロンオーダーの粒子としての視点では柱状晶と同じもので、晶析後の固液

分離操作における付着残流母液の低減効果も期待できる。

本研究では、冷却晶析の過程で超音波を照射することで、通常は板状の α 形結晶が得られる冷却条件でも、固液分離した際に結晶粒子に付着残留する母液量が少なくなることが期待される柱状結晶粒子が、L-アスパラギン酸については比較的容易に得られることが明らかになった。しかし、有機結晶粒子生成時の超音波照射の効果については未知な部分が多く残されており、近年特に期待が高まっている医薬品などの複雑な有機化合物の晶析についても、超音波照射の効果を多角的に試験し、その有効性と限界について検討していく必要があると考えられる。

4. 結 言

L-アスパラギン酸の冷却晶析における結晶粒子形状の簡便な制御法を得ることを目的として、超音波照射の適用を試み、照射強度および照射時間が結晶粒子の二軸平均径や短長比に及ぼす影響について検討し、以下の結果が得られた。

- 1) 本研究における全ての操作条件下で生成される結晶は、 α 形板状晶であった。
- 2) 照射時間1分の場合に、どの照射強度でも無照射時に比べて柱状粒子の割合が多くなったが、照射時間が長くなるにつれて、その割合が減少した。また、46 W/cm²で1分間照射した場合に、柱状の結晶粒子の割合が最も多くなり、その柱状粒子は小さな板状 α 形晶が積層した集片双晶であることが明らかになった。
- 3) 超音波を1分間照射した後の結晶粒子二軸平均径の経時変化は照射強度に依存し、46 W/cm²と67 W/cm²強の場合には、1～5時間程度の放置でもその分布形は変化しなかった。

References

- 1) Mori, Y., N. Kato and S. Fujii: "Aspartic acid crystal", Japanese Published Unexamined Patent Application, No. 1996-217733 (1996)
- 2) Mori, Y., N. Kato and S. Fujii: "L-aspartic acid crystal", Japanese Published Unexamined Patent Application, No. 1997-323961 (1997)
- 3) Hirayama, N., Ed., "Handbook of Crystallization of Organic Compounds", Chapter 7 (by S. Nagashima, T. Sano and K. Hasegawa), p. 186, Maruzen, Tokyo (2008)
- 4) Kordylla, A., S. Koch, F. Tumakaka and G. Schembecker: "Towards an optimized crystallization with ultrasound: Effect of solvent properties and ultrasonic process parameters", *J. Crystal Growth*, **310**, 4177-4184 (2008)
- 5) Guo, Z., M. Zhang, H. Li, J. Wang and E. Kougioulos: "Effect of ultrasound on anti-solvent crystallization process", *J. Crystal Growth*, **273**, 555-563 (2005)
- 6) Kurotani, M., E. Miyasaka, S. Ebihara and I. Hirasawa: "Effect of ultrasonic irradiation on the behavior of pri-

- mary nucleation of amino acids in supersaturated solutions”, *J. Crystal Growth*, **311**, 2714-2721 (2009)
- 7) Luque de Castro, M. D. and F. Priego-Capote : “Ultrasound-assisted crystallization (sonocrystallization)”, *Ultrasonics Sonochemistry*, **14**, 717-724 (2007)
 - 8) Kurotani, M. and I. Hirasawa : “Effect of ultrasonic irradiation on the selective polymorph control in sulfamerazine”, *Chem. Eng. Res. Des.*, **88**, 1272-1278 (2010)
 - 9) Narducci, A., A. G. Jones and E. Kougoulos : “Continuous crystallization of adipic acid with ultrasound”, *Chem. Eng. Sci.*, **66**, 1069-1076 (2011)
 - 10) Koda, S., T. Kimura, T. Kondo and H. Mitome : “A standard method to calibrate sonochemical efficiency of an individual reaction system”, *Ultrasonics Sonochemistry*, **10**, 149-156 (2003)
 - 11) Kishishita, A., S. Kishimoto and N. Nagashima : “Characterization of organic crystal products”, *J. Crystal Growth*, **167**, 729-733 (1996)
 - 12) Derissen, J. L., H. J. Endeman and A. F. Peerdeman : “The crystal and molecular structure of L-aspartic acid”, *Acta Cryst.*, **B24**, 1349-1354 (1968)
 - 13) Editorial committee of K. S. J., “Kessyo Seityogaku Jiten (Dictionary of Crystal Growth)”, Kyoritsu-pub., p. 133, Tokyo (2001)