薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
105 (3) 289—295 (1985)

セファロチンナトリウムの凍結相における結晶成長 (第3報¹⁾)
結晶成長速度に及ぼす有機溶媒の影響

井上正義,^{*,a} 田中廣義,^a 島 和弘,^a 稲津邦平^b
塩野義製薬株式会社研究所,^a 塩野義製薬株式会社製造部^b

Crystal Growth of Cephalothin Sodium in Frozen Solution. III.¹⁾
Effect of Organic Solvent on Growth Rate

MASAYOSHI INOUE,^{*,a} HIROYOSHI TANAKA,^a KAZUHIRO SHIMA,^a
and KUNIHEI INAZU^b

Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.,^a Fukushimau, Osaka, 553,
Japan and Production Department, Shionogi & Co., Ltd.,^b
Imafuku-142, Amagasaki, Hyogo, 660, Japan

(Received September 7, 1984)

The effect of organic solvent on the growth rate of cephalothin sodium (KF) after seeding in frozen solution was investigated. All of used solvents accelerated crystal growth of KF and it was found that the accelerative effect of solvent increased with an increase in dielectric constant of solvent. KF formed micelle in aqueous solution and the solvent lower the freezing temperature of the micelle and it can be assumed that the lowering of the freezing temperature of the micelle related to the volume of solvent existing in the micelle. Alcohol lower larger the freezing temperature of the micelle than ketone and nitrile, but the accelerative effect of alcohol on the growth rate was less than that of ketone and nitrile. The effect of the concentration of ethanol and acetone was investigated and it seemed that ethanol accelerated nucleation. Nevertheless, the accelerative effect of ethanol on the growth rate was less than that of acetone. These results suggested that simultaneous use of solvent having a different mode of action is effective for crystallization of KF in frozen solution by spontaneous nucleation.

Keywords—cephalothin sodium; organic solvent; frozen solution; crystal growth; kinetics; micelle

緒 言

セファロチンナトリウム (KF) は凍結相において自然成核しにくい薬物で通常の凍結乾燥品は非晶質である。結晶性凍結乾燥製剤の製造には、種晶を添加し凍結相中で結晶化を完了させる必要がある。²⁾ 種晶を添加した場合の凍結相での KF の結晶成長速度は (1) 式で表された。

$$1 - (1 - \alpha)^{1/3} = (1/3 N) (Kt)^N \quad \cdots (1)$$

(1) 式において、 α : 結晶化度, K : 速度定数, t : 時間, N : 種晶量, 凍結温度に依存するパラメーターである。

凍結相における KF の結晶成長速度は、19.4—28.6% の濃度範囲で KF 濃度の影響は認められなかった。しかし、種晶量、凍結温度の影響は大きく、種晶量の増加とともに結晶成長速度は早くなり、KF 水溶液の共晶温度近辺で結晶成長速度は最も早くなった。¹⁾

種晶を加えずに KF 水溶液の凍結相で KF を結晶化させる特許が知られている。³⁾ これらの特許は、低級アルコール、アセトンなどの有機溶媒を KF 水溶液に添加し凍結させた後、凍結温度を一定または変化させて自然成核を促し、凍結相において KF を結晶化させる方法である。しかし、凍結相における結晶成長速度に及ぼす有機溶媒の効果について、詳細に検討した報告はない。本報において、KF の凍結相における結晶成長に及ぼす溶媒の種類、濃度の影響を調べ、有機溶媒の結晶成長促進作用について新たな知見を得たので報告する。

実験の部

試料 セファロチンナトリウム (KF) は、日抗基品を水-エタノールから再結晶して用い、水は蒸留水を用いた。有機溶媒は市販の特級品を用いた。

種品の調製 KF 結晶をメノウ乳鉢で微細化し平均粒子径 $3.2 \pm 1.7 \mu\text{m}$ の粉末にし、所定濃度の KF エタノールけん濁液を調製して種品溶液とした。なお種品の平均粒子径は顕微鏡写真法により求めた。

電気伝導度の測定 所定濃度の種品けん濁液 $10 \mu\text{l}$ を試験管にとり、減圧乾燥でエタノールを除いた。所定濃度の有機溶媒を含む 23% KF 水溶液 1 ml を加え、サーモミキサーで振とうしたのち、ただちに白金電極と温度計端子を挿入してアセトン-ドライアイスで凍結させた。 -50°C 以下に冷却されたことを確認した後、 -10°C に設定したハーケ F2 型恒温槽に浸漬した。電気伝導度 (伝導度) はメトローム 518 型電気伝導度計、温度はタカラ SP-01-5A 型サーミスター温度計でそれぞれ測定し、日立 056 型レコーダーで記録した。

結晶化度の計算 初期伝導度 (λ_T) と t 時間後の伝導度 (λ_t) から結晶化度 (α_t) は $\alpha_t = (\lambda_T - \lambda_t) / \lambda_T$ で計算した。⁴⁾

パラメーター N 及び速度定数の計算 Cannon BX-30 型, NEC PC-100 型パーソナルコンピュータで、山岡ら⁵⁾のプログラムを用いて計算した。

熱分析の測定 測定には、パーキンエルマー DSC-2 型示差走査熱量計を用いた。試料 $10 \mu\text{l}$ をアルミパンに入れシールした。対照には空のアルミパンをシールしたものを用いた。試料室をアセトン-ドライアイスで -50°C に冷却後、 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ で昇温させ、感度 20 m cal/s 、チャートスピード 10 mm/min で測定した。温度は 2.5% 塩化ナトリウム水溶液と、2.5% 塩化カリウム水溶液を上記測定条件で熱分析して得た共晶温度を用いて補正した。なお、共晶温度は differential scanning calorimetry (DSC) の吸熱変化の始まる温度とした。

溶解度の測定 内容 5 ml の広口アンプルに 5 M の有機溶媒水溶液 2 ml と KF 結晶を入れ融閉した。アンプルは 5°C と 35°C の恒温水槽中で 5 時間振とうした。過剰の結晶をミリポアフィルター FHL-013 で濾別し、濾液の 1 ml を所定量の水で希釈、KF 濃度は、島津 UV-150-02 型分光光度計を用い、237 と 265 nm の吸光度から計算した。

結果及び考察

1) 有機溶媒添加時の KF の結晶成長速度

有機溶媒を 1%(v/v) 添加した 23% KF 水溶液に種晶量 (α_0) 1.5×10^{-3} を加え、 -10°C の凍結相で KF の結晶成長速度を測定した。Fig. 1 に前報¹⁾と同様に、(1) 式のパラメーター N の値を 2.5 とした (2) 式を適用したときの結晶化度の実測値と計算値の関係の代表的な例を示す。Table I に (2) 式で求めた速度定数 (K)、残査標準偏差 (SDR) の値を示す。SDR は (3) 式を用いて計算した。

$$1 - (1 - \alpha)^{1/3} = (1/7.5)(Kt)^{2.5} \quad \dots\dots (2)$$

$$\text{SDR} = (\text{SS}/(n-1))^{0.5} \quad \dots\dots (3)$$

(3) 式において、SS: 残査 2 乗和, n : 測定点の数である。

ジオキサン、スルホランを除いた他の溶媒を添加したときの KF の結晶成長は (2) 式で表された。また、いずれの溶媒にも、凍結相における KF の結晶成長速度を促進させる作用が認められたが、溶媒の種類によって促進効果は異なった。

再結晶溶媒と結晶多形の関係が、tagafur,^{6a)} sodium ampicillin,^{6b)} sulfathiazole,^{6c)} caffeine,^{6d)} などの多くの薬物で認められているが、KF は唯一の結晶形しか認められない。⁷⁾ したがって、有機溶媒が凍結相において KF の結晶成長速度を促進する現象を多形の生成で説明できない。

Fig. 1. Crystal Growth of Cephalothin Sodium in 23% Frozen Solution Containing 1% (v/v) Organic Solvent at -10°C , $\alpha_0 = 1.5 \times 10^{-3}$

○, isopropanol (SDR=0.028); ●, acetone (SDR=0.020); △, ethyl ether (SDR=0.029); ▲, control (SDR=0.015); □, sulfolane (SDR=0.053); ■, dioxane (SDR=0.069); —, calculated curves from equation (2).

TABLE I. Growth Rate of Cephalothin Sodium in 23% Frozen Solution Containing 1% (v/v) Organic Solvent at -10°C , $\alpha_0=1.5\times 10^{-3}$

Solvent	K (min^{-1})	SDR	Solvent	K (min^{-1})	SDR
Control	0.0267	0.019	Acetone	0.101	0.021
Methanol	0.0705	0.022	MEK ^{b)}	0.0796	0.022
Ethanol	0.0723	0.020	IBK ^{c)}	0.0508	0.016
<i>n</i> -Propanol	0.0747	0.022	MA ^{d)}	0.0466	0.022
<i>n</i> -Butanol	0.0617	0.019	EA ^{e)}	0.0468	0.018
Isopropanol	0.0663	0.027	Acetonitrile	0.115	0.026
Isobutanol	0.0572	0.014	Propionitrile	0.0858	0.033
Isopentanol	0.0499	0.021	Dioxane	0.0327	0.066
<i>tert</i> -Butanol	0.0665	0.020	DCM ^{f)}	0.0408	0.024
Ethylether	0.0490	0.028	Sulfolane	0.0388	0.053
IPE ^{a)}	0.0387	0.013			

a) isopropyl ether; b) methyl ethyl ketone; c) isobutyl ketone d) methyl acetate; e) ethyl acetate; f) dichloromethane

2) 有機溶媒-水系への KF の溶解度と結晶成長速度の関係

Table II に 5 M 濃度の有機溶媒水溶液への KF の溶解度を 5°C と 25°C で測定した結果を示す。アセトン、メタノール、*n*-プロパノール、ジオキサンは 5°C と 25°C の溶解度比を増加させたが、アセトニトリルは、 5°C と 25°C の溶解度比を増加させなかった。

種晶を添加せずに凍結相において KF を結晶化させる特許が知られている。⁸⁾ これらの特許は、KF 水溶液に有機溶媒を加え凍結させて annealing して KF の結晶核を生成させる方法であり、有機溶媒が結晶核の生成を促進する理由は、KF の溶解度を低下させるためと考えられている。⁸⁾ また、我々は凍結相において自然成核のしやすい薬物の溶解度の Van't Hoff plot から得られる溶解熱が大きいこと、及び KF の溶解熱が小さく自然成核しにくいことに、KF は凍結相において結晶化しにくいことを明らかにした。⁷⁾

アセトン、メタノール、*n*-プロパノールが種晶を添加した凍結相での KF の結晶成長速度を促進させる理由として、新たな結晶核の生成を促進させるためと考えられるが、一方、アセトニトリルは大きな結晶成長促進作用を有するにもかかわらず、KF の溶解度の温度依存性は小さく、種晶を添加した凍結相での KF の結晶成長速度が、新たな結晶核の生成速度だけに依存するのではないことが明らかになった。晶析(結晶化)は核生成と核からの成長からなり、アセトニトリルの場合、核生成が速くなると考えられないことから結晶化速度への成長速度の影響が大きいと考えられる。

3) 有機溶媒の誘電率と結晶成長促進効果の関係

Fig. 2 に 1%(v/v) の有機溶媒を含む 23% KF 水溶液の -10°C の凍結相中で、 $\alpha_0=1.5\times 10^{-3}$ からの KF の結晶成長速度と有機溶媒の誘電率の関係を示す。スルホランを除いて、誘電率が大きくなるに従って、結晶成長速度は早くなる傾向が認められ、この傾向は同族体の間で顕著であった。

再結晶溶媒の違いによる結晶多形の生成が知られているが、砂田⁹⁾らは、アンピシリンナトリウムの結晶多形の研究において、有機溶媒の薬物と水の結合に対する作用が有機溶媒の誘電率に依存し、その結果、結晶多形が生成すると考察している。凍結相における KF の結晶成長過程においても KF が結合水と分離する過程を通る

TABLE II. Solubility of Cephalothin Sodium into 5 M Aqueous Solution of Organic Solvent

Solvent	Solubility (mg/ml)		Solubility ratio ^{a)}
	5°C	25°C	
Acetone	133	237	1.8
Methanol	114	189	1.7
<i>n</i> -Propanol	130	268	2.1
Dioxane	185	249	1.4
Acetonitrile	309	346	1.1
Control	235	275	1.2

a) Solubility at 25°C /solubility at 5°C .

Fig. 2. Relationship between Growth Rate and Dielectric Constant

1, methanol; 2, ethanol; 3, *n*-propanol; 4, *n*-butanol; 5, isopropanol; 6, isobutanol; 7, isopentanol; 8, *tert*-butanol; 9, acetone; 10, methyl ethyl ketone; 11, isobutyl ketone; 12, acetonitrile; 13, propionitrile; 14, ethyl ether; 15, isopropyl ether; 16, methyl acetate; 17, ethyl acetate; 18, dioxane; 19, dichloromethane; 20, sulfolane; dielectric constant is value at 20°C (closed symbol) or at 25°C (open symbol).¹⁰⁾

Fig. 3. Relationship between Growth Rate and L Value

Number represents solvent shown in Fig. 2.

と考えられ、有機溶媒による結晶成長の促進が、KF が結合水から分離する段階でも起きると考えられる。

4) 凍結構造の緩和と結晶成長速度の関係

用いた溶媒と水の共晶温度は、*tert*-ブタノール (-8.1°C)、ジオキサン (-12.6°C)、スルホラン (-10.5°C)を除いて低く、 -10°C においては有機溶媒は液体状態で存在している (また、水に対する溶解度の小さい溶媒は、一部水と分離しているかもしれない)。

有機溶媒を含まない KF 水溶液の場合、KF-水系の共晶温度は -3°C であることから、 -10°C では自由水は凝固し、氷晶間げき中の concentrated amorphous solution (CAS) はほとんど固体に近い状態であることが、凍結相における結晶成長の活性化エネルギーの値から明らかである。¹⁾ 有機溶媒を含む KF 水溶液の場合、氷晶間げき中に液体の有機溶媒-水-KF の混合物が存在し、有機溶媒を含む KF 水溶液の凍結相での粘性は、溶媒を含まない場合に比べて低下していると考えられる。

結晶成長前の伝導度を λ_T 、結晶成長が進行しなくなった時点の伝導度を λ_{∞} として L 値を (4) 式で計算した。

$$L = 100(\lambda_{\infty}/\lambda_T) \quad \dots\dots (4)$$

有機溶媒を含まない場合は、 $L=0$ であるが、有機溶媒を含む場合は、 L 値は有機溶媒の種類によって異なるが $L>0$ であった。 L 値は結晶成長停止後に残存する KF の非晶質量を表し、凍結相の氷晶間げき中の KF を溶解させる能力のある液体部分の大きさの指標とも考えられる。

Fig. 3 に結晶成長速度と L 値との関係を示す。ケトン、ニトリルにおいて、 L 値の増加に伴い結晶成長速度が増加する傾向が認められるが、ジオキサン、酢酸メチル、メタノールなどは L 値が大きい割に結晶成長速度は小さく、全体として、 L 値と結晶成長速度との関係は認め難い。

L 値は凍結相で結晶化せずに残存する KF の非晶質量を表し、定性的に氷晶間げき中の KF を溶解する能力を有する液体部分の大きさを表している。有機溶媒を含まない凍結相の KF の CAS に比べて、有機溶媒を含む KF の CAS の粘性は低下していると考えられる。粘性の低下は結晶成長に有利に作用するが、有機溶媒を含む CAS の粘性の大きさは、有機溶媒の種類によって異なり、 L 値との相関性は小さいと思われる。

L 値の大きな溶媒は、凍結相での残存非晶質量を多くし、結晶性凍結乾燥製剤の品質を低下させる。したがって、結晶成長促進剤として添加する有機溶媒は結晶成長促進効果が大きく、しかも L 値の小さい方がよい。

5) ミセルの凍結温度と結晶成長速度の関係

KF 濃度を変化させて KF 水溶液の核磁気共鳴スペクトル (NMR), pH を測定した結果から, KF がミセルを形成すること, KF 水溶液の非晶凍結相で -18°C に DSC の小さな吸熱ピークが認められ, KF のミセルが -18°C で凍結すると報告した.⁷⁾

Fig. 4 に 1%(v/v) の有機溶媒を含む 23% KF 水溶液の熱分析の代表的な例を示す. 用いた有機溶媒は, いずれもミセルの凍結温度を低下させ, 凍結温度は溶媒種により異なった.

Fig. 5 に L 値とミセルの凍結温度の関係を示す. アルコール類はミセルの凍結温度の低下と共に L 値の増加する傾向が顕著であった. しかし, ケトン, ニトリル, ジオキサン, 酢酸メチルなどは, アルコール類ほどミセルの凍結温度を低下させないにもかかわらず, 大きな L 値であった.

氷晶間げき中の有機溶媒を含む KF の濃縮されたミセル溶液の凍結温度は, ミセル内へ入る溶媒の量に依存すると考えられる. したがって, ケトン, ニトリルなどが大きな L 値を示すにもかかわらず, ミセルの凍結温度がアルコール類にくらべて高いのは, ケトン, ニトリルなどがアルコール類に比べて, KF のミセル中へ入り難いことを示していると考えられる.

Fig. 4. Freezing Temperature of Micelle in 23% Aqueous Solution of Cephalothin Sodium Containing 1% (v/v) Organic Solvent

A, control; B, ethyl ether; C, acetonitrile; D, methanol.

Fig. 5. Relationship between L Value and Freezing Temperature of Micelle

Number represents solvent shown in Fig. 2.

Fig. 6 に有機溶媒を 1% (v/v) 添加した時の結晶成長速度とミセルの凍結温度の関係を示す. アルコール, エーテルではミセルの凍結温度の低下に従い, 直線的に結晶成長速度が増したが, ケトン, ニ

Fig. 6. Relationship between Growth Rate and Freezing Temperature of Micelle

Number represents solvent shown in Fig. 2.

Fig. 7. Photograph of Gel of Cephalothin Sodium

1, water; 2, cephalothin sodium-water-dioxane (0.25:1:7).

TABLE III. Effect of Concentration of Ethanol and Acetone on Crystal Growth of Cephalothin Sodium at -10°C , $\alpha_0=1.5\times 10^{-8}$

Solvent	Concn. % (v/v)	$N^a)$	SDR ^{a)}	N	$K^b)$ (min^{-1})	SDR ^{b)}
Ethanol	0.5	2.21	0.018	2.5	0.0486	0.017
	1.0	2.17	0.012	2.5	0.0723	0.020
	1.5	1.83	0.017	2.5	0.112	0.040
Acetone	0.5	2.32	0.023	2.5	0.0591	0.018
	1.0	2.43	0.020	2.5	0.101	0.021
	1.5	2.35	0.019	2.5	0.154	0.018
Control		2.37	0.019	2.5	0.0267	0.019

a) equation (1), b) equation (2).

トリルなどは、ミセルの凍結温度の少しの低下で大きく結晶成長速度が増加し、結晶成長速度の促進機構が溶媒によって異なることが示唆された。

ジオキサン、スルホラン、酢酸メチルなどは、アセトンと同程度にミセルの凍結温度を低下させたが、これらの溶媒の結晶成長促進作用は小さかった。ジオキサンの場合、Fig. 7 に示すようにゲルを形成し、特別の interaction が存在することが明らかになった。スルホラン、酢酸メチルの場合にはゲルの形成は認められないが、KF との間に何らかの interaction が存在するのかもしれない。

また、けん濁剤中の結晶成長を抑制する方法として、ポリビニールピロリドン、メチルセルロースを添加する特許が知られている。⁸⁾ これらは主として結晶表面への作用と考えられ、凍結相における KF の結晶成長速度に及ぼす有機溶媒の作用の1つとして、結晶表面への作用も考えられるが現在は明らかでない。

6) エタノール、アセトンの濃度の影響

Table III にエタノール、アセトンの添加濃度を 0.5—1.5%(v/v) に変化させ、 -10°C の凍結相において結晶成長させた場合の (1) 式におけるパラメーター N の値を示す。 N の値は、エタノールの場合には濃度の増加とともに小さくなる傾向が認められたが、アセトンの場合にはほとんど変化が認められなかった。(1) 式における N は結晶核の生成に関するパラメーターであり、⁹⁾ エタノールの場合には濃度の増加に伴い結晶核の生成の様子が変化することを示している。

Table III に (2) 式から求めた結晶速度定数の値を示す。エタノール、アセトンのいずれの場合も濃度の増加とともに成長速度は速くなったが、増加の割合はアセトンの方が大きかった。これは種晶を添加した場合の KF の結晶成長に対してミセル中へ多く入り、核生成の様子を変化させるエタノールよりもミセル外部に多く存在しているアセトンの方が、促進作用が大きいことを示している。

以上の結果は、核生成に有効な有機溶媒がかならずしも最良の結晶成長促進剤でないことを示し、種晶を添加しない KF の結晶性凍結乾燥製剤の製造において、ケトン類とアルコール類の併用が晶析時間の短縮化に有効と考えられる。

種晶を添加する KF の結晶性凍結乾燥製剤の製造において、有機溶媒は結晶成長速度を速めるが、一方では凍結相での残存非晶質を増加させた。有機溶媒を含む凍結相では、凍結乾燥中の有機溶媒の蒸発に伴う結晶化が起きると考えられ、凍結相での L 値と凍結乾燥後の非晶質量は、かならずしも一致しない。

したがって、添加溶媒の種類、濃度の選択は、最終的には凍結乾燥後の品質で行われるべきである。凍結乾燥後の残存非晶質量は、高感度の熱分析法²⁾ によって測定され、KF の結晶性凍結乾燥製剤の品質の保証が行われている。

結 論

種晶を添加した凍結相での KF の結晶成長速度に及ぼす有機溶媒の影響を調べた。用いた有機溶媒はいずれも KF の結晶成長速度を促進したが、その作用は、誘電率、氷晶間げき内の濃厚 KF 溶液の粘性の変化、溶解度、結晶表面への影響などが複雑にからみ合った結果であることが明らかになった。また、結晶性凍結乾燥製剤の製造に

において、結晶成長速度だけでなく、残存非晶質量、凍結乾燥による除去されやすさなどの観点から、添加する有機溶媒は選択されるべきである。

引用文献

- 1) 井上正義, 島 和弘, 稲津邦平, 薬誌, **104**, 1268 (1984).
- 2) 武田豊彦, 鈴木裕介, 稲津邦平, 坂元照男, 前川秀幸, 日本薬学会第 103 年々会で発表, 東京, 1983, p. 642.
- 3) a) マイケル・デービット・シーズ, マイケル・レリー・ロイ, 公開特許公報, 昭 54-73115 (1979); b) 篠原和久, 長南義勝, 橘 滋, 小林正和, 砂間良二, 公開特許公報, 昭 56-120615 (1981).
- 4) 井上正義, 島 和弘, 稲津邦平, 薬誌, **104**, 966 (1984).
- 5) K. Yamaoka, Y. Tanigawa, T. Nakagawa, T. Uno, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **4**, 879 (1981).
- 6) a) 仲井由宣, 山本恵司, 寺田勝英, 内田 武, 山口啓一, 清水昶幸, 日本薬学会第 103 年々会, 東京, 1983, p. 640; b) 砂田勉生, 西島功二, 杉本圭一, 森下至郎, 武田研, **29**, 488 (1970); c) M. A. Moustafa, J. E. Carless, *J. Pharm. Pharmacol.*, **21**, 359 (1969); d) J. B. Bogardus, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 837 (1983).
- 7) 井上正義, 島 和弘, 稲津邦平, 薬誌, **104**, 981 (1984).
- 8) a) 北森信之, 田辺和久, 河尻晴三, 美間博之, 特許公報, 昭 48-30372 (1973); b) 岡田隆三; 塚田和弘, 加藤 亘, 公開特許公報, 昭 54-115338 (1979).
- 9) 小松和蔵, 日化, **78**, 1452 (1957).
- 10) a) D. Dobos, "Electrochemical Data," Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 1975; b) J. A. Riddick, W. B. Bunger, "Organic Solvent," Techniques of Chemistry Vol. II, John-Wiley & Sons, Inc., New York, 1970.