

平成21年6月17日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19560758
 研究課題名（和文） 結晶核発生における不連続非平衡メカニズムの解明とナノ結晶製造への展開
 研究課題名（英文） Study on discontinuous nonequilibrium mechanism in crystal nucleation and its application to production of nanocrystals
 研究代表者
 大嶋 寛 (OOSHIMA HIROSHI)
 大阪市立大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：20112526

研究成果の概要：

医薬化合物のナノ結晶製造を目指して、結晶核発生のメカニズムを解析するとともに、核発生のタイミングを揃えるための晶析操作について検討した。核発生のタイミングを制御する手法として、「熱履歴操作による核発生のタイミング制御」と「マイクロ波照射による核発生タイミング制御」を考案し、新しい晶析装置の開発を行った。そして、それらの手法が均一な微細結晶を製造するための手段として有効であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：核形成メカニズム、粒径分布、結晶、晶析、マイクロ波、溶液の熱履歴、核発生、微結晶

1. 研究開始当初の背景

結晶製造において制御したい代表的な特性の一つに粒径と粒径分布がある。現在開発中の医薬は水難溶性であるものが多く、血中に直接投与するために100nm程度の結晶を製造することが要求されている。粉砕を必要としないほど小さくて粒径分布が狭い結晶を得るためには、初期過飽和度を高くして核発生のタイミングを揃えることが重要である。さらに小さくなってナノサイズの結晶製造では特にこのような操作が必要である。しかし、有機化合物の核発生については十分に理

解できていないこともあって、有機ナノ結晶の製造は世界でも満足な成功例がない。

2. 研究の目的

(1) 核発生のメカニズム

核発生のタイミングを揃えるためには、核発生プロセスを理解することが重要であるが、まだ多くの未解明の問題が残っているのが現状である。そのような問題の一つに誘導期の存在が挙げられる。溶液が過飽和状態になっても、すぐには結晶が現れず、長い誘導期が存在する。そして、一度結晶が発生する

と連鎖的に大量の結晶が析出する現象が観察される。本研究では、既に存在する結晶がどのようなメカニズムで次の核発生を誘導するのかに着目して、円盤状晶析装置を製作し、核発生メカニズムの解明を試みた。

(2) 反復冷却晶析による核発生のタイミング制御

結晶中では、溶質分子同士が水素結合などの分子間相互作用を形成して、規則正しく整列している。つまり、溶液から結晶が析出するという事は、正しい相互作用のみで溶質分子が集合することである。従って、これらの相互作用の制御が核形成のタイミングを制御する上で重要であると考えられる。そこで、本研究では一度結晶化した溶質を飽和濃度近傍で溶解させ、正しい分子間相互作用を溶液中で維持したまま再び結晶化を行い、核形成のタイミング制御を試みた。

(3) マイクロ波照射による核発生タイミング制御

結晶核発生がランダムに起こると、結果的にブロードな粒径分布をもつ結晶がえられる。均一な結晶を得るためには、ランダムな核発生を抑制し、あるタイミングで一気に核発生を起こさせる必要がある。また、微結晶を得たい場合、より高過飽和状態になるまで溶液中での核発生を抑制し、その後大量に核発生を起こさせればよいと考えられる。そこで、本研究ではマイクロ波照射により溶質分子の極性基を強制的に振動させ、核発生を阻止するという手法を考案し、装置の製作と結晶化を試みた。

3. 研究の方法

(1) 核発生のメカニズム

実験で用いた新規な円盤状晶析装置を Fig.1 に示す。上部ステンレス板と下部ステンレス板に挟まれた厚さ 1.5 ~ 3 mm の傾斜した空間に、L-アラニン水溶液(C/Cs = 1.2)を満らし、20°Cのインキュベータ内で1時間保持した。装置の中心から1個の種晶を溶液に静かに添加後、装置の底面から市販のスキヤナまたはデジタル顕微鏡を用いて結晶が析出する様子を記録した。デジタル顕微鏡(×100倍)には自動ステージを取り付けており、2分間1サイクル

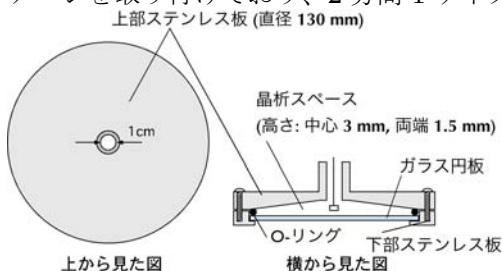


Fig.1 平板状晶析装置

として、2秒毎に50μmずつ60段階下降させながら撮影した。得られた画像から、結晶の大きさや位置を計測し、成長速度及び核発生位置を算出した。

(2) 反復冷却晶析による核発生のタイミング制御

実験に使用した晶析装置を Fig.2 に示した。中央部の銅製のブロックで溶液の入ったセルを固定し、両側のペルチエ素子で加熱冷却制御を行う。溶液にレーザーを照射し、溶液の斜め前方への散乱光強度をモニタリングすることで結晶析出を検出する。溶液の攪拌にはマグネチックスターラーを用いた。

所定濃度の PAC 溶液を調製してガラスセルに入れ、晶析装置にセットした。溶媒にはメタノールを用いた。40°Cで24時間保持した後、5°Cでの結晶化と17°Cでの再溶解を1~5回繰り返した。溶液からの散乱光強度をモニタリングして、5°Cに冷却を始めてから結晶が析出するまでの待ち時間を測定した。また、17°Cで加熱する時間を5~90分と変化させ、再溶解時間が待ち時間に及ぼす影響についても検討した。

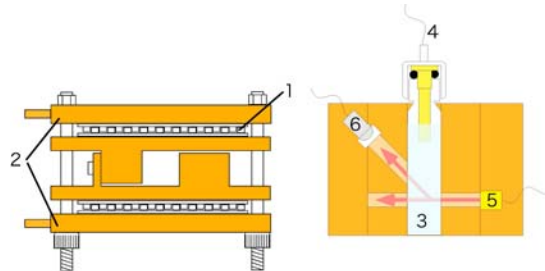


Fig.2 再溶解結晶化操作に用いた晶析装置 (1ペルチエモジュール、2冷却板、3晶析セル、4温度センサ、5レーザー光源、6フォトダイオード)

(3) マイクロ波照射による核発生タイミング制御

マイクロ波発生装置として、均一な電磁波を連続的に照射できる IDX 社製グリーンモーターを用いた (Fig.3)。所定量の IBP をヘキサミンに 40°Cで溶解させた後、溶液 7 mL をウォータージャケット付きガラス管に入れ、500 rpm で攪拌しながら所定の温度まで冷却した。マイクロ波は、飽和度が 1.0 になった時点で照射した。析出した結晶は孔径

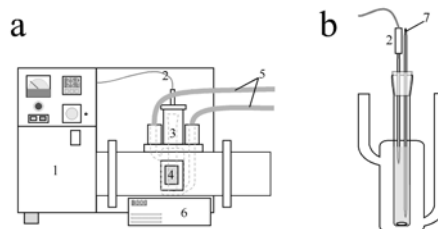


Fig.3 マイクロ波照射晶析装置 (1マイクロ波照射装置、2温度センサ、3ガラス晶析容器、4観察窓、5冷却循環ホース、6マグネチックスターラー、7サンプリングチューブ)

0.1 μm のメンブランフィルターで濾過し、走査型電子顕微鏡 (SEM) による結晶形状の観察および粒径の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 核発生のメカニズム

円盤装置の晶析スペースの中心に種晶を静かに添加して結晶化を行ったところ、時間とともに中心から離れた位置に結晶が析出していくことがわかった。

この結晶の広がり詳細に調べるために、デジタルマイクログラフを用いて、結晶が析出する様子を観察した。晶析時間の進行とともに、微小な棒状結晶が移動しながら落下している様子がいくつか観察された。観察している領域に析出した7個の結晶の位置をそれぞれ中心からの距離 r 、晶析スペースの高さ Z について整理したものをFig. 4に示す。斜線部分は晶析装置のテーパ部、水色の領域は視野範囲を示している。1番、2番の結晶は晶析空間の上部で発生していることがわかった。一方、3番から7番の結晶については、観察視野外で発生したため、どこで発生したのかを特定することはできなかった。

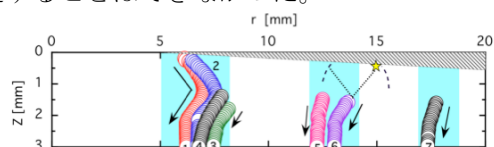


Fig. 4 平板状晶析装置で確認された結晶の、水平及び垂直位置の変化

次に、中心からの距離 r が18~20 mmの領域において、高さの異なる3カ所で観察された結晶の個数を調べた。 $Z=0.6$ mmでは結晶数は46個、1.2 mmでは65個、1.5~2.0 mmでは157個が確認された。晶析スペースの下層ほど結晶数が増えている。これらの結晶について粒径分布をとったところ、晶析スペースの上部では小さい結晶が多く存在し、下層にいくほど結晶は大きくなり、小さい結晶も共存していることがわかった (Fig. 5)。従って、上層で核

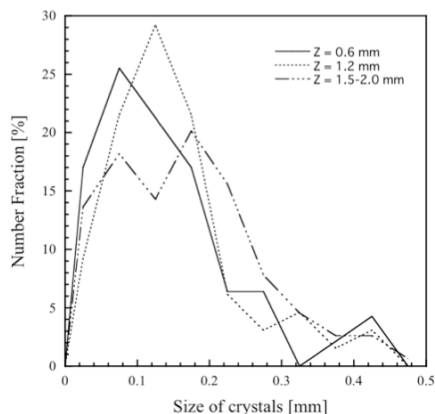


Fig. 5 高さの異なる3カ所で観察された結晶の粒径分布

発生し落下している結晶ばかりではなく、中部でも結晶が発生しており、成長とともに落下しているものも多く存在することがわかった。

以上の結果から、既に存在する結晶 (種結晶) が周りの溶液中における核発生を誘導していることがわかった。また、自動的に高さを制御できるマイクログラフを用いることで、結晶が発生した位置について高さに関する情報も得ることができた。結晶周辺の溶液の情報も得ることが核発生の伝搬メカニズムを明らかにする上で重要であることがわかったため、新たにレーザー光の散乱を利用して結晶化を観察するための装置を作製し、実験を継続中である。

(2) 熱履歴操作による核発生のタイミング制御

実際の実験における溶液温度と散乱光強度の経時変化を Fig. 6 に示す。最初の冷却晶析では結晶析出までに長い誘導期間を要したが、再溶解操作を行うことにより析出までにかかる時間が短くなった。Fig. 7 に再溶解のための加熱時間と誘導期間の関係を示した。再溶解操作を行わなかった場合、10分から200分まで誘導期間にバラツキが見られたのに対し、20分及び40分の再溶解処理後に再び冷却した場合は誘導期間が非常に短くなった。20分の再溶解処理で結晶が完全に溶

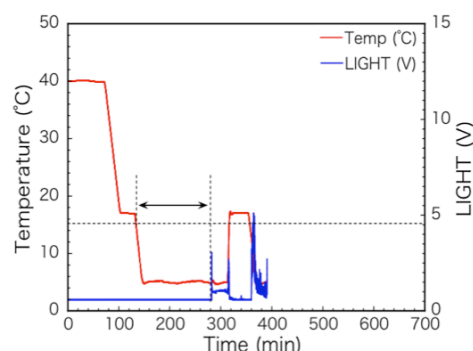


Fig. 6 反復冷却晶析操作における溶液温度と散乱光強度の経時変化

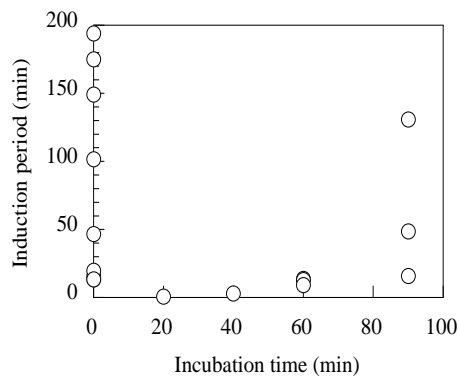


Fig. 7 結晶化待ち時間に及ぼす加熱保持時間の影響

解することを別の実験で確認している。従って、これらの結果は、再溶解処理をしても分子間相互作用は失われておらず、それらの分子間相互作用の保存が次の冷却時の核発生に有利に働いたことを示唆している。一方、90分間加熱処理を行うと、誘導期間にバラツキが現れた。そのため、長時間の再溶解処理は分子間相互作用までも壊してしまい、もとの溶解状態に近づいたものと思われる。

これらの実験で得られた結晶を回収し、粒径分布測定した (Fig. 8)。再溶解操作を行わなかった場合と 90 分の再溶解操作を行った場合に得られた結晶の粒径分布はブロードであるのに対し、20 分の再溶解処理を行ったものは粒径分布が狭く、小さな結晶が得られた。20 分間再溶解操作処理をした場合、冷却後に速やかに核発生が起こるため、結晶化のタイミングが揃い、しかも大量に核が発生したためであると考えられる。

以上の結果から、結晶の完全溶解操作を組み込んだ晶析操作を行うことにより、核発生のタイミングをそろえ、均一な微結晶が得ら

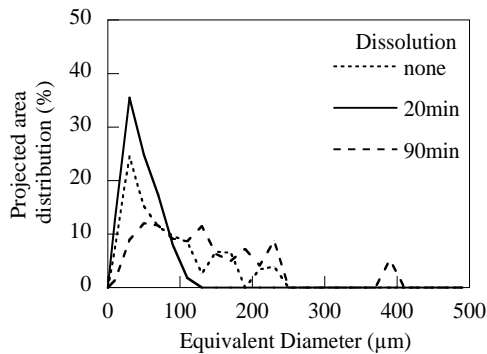


Fig. 8 反復冷却操作で得られた結晶の粒径分布

れることがわかった。

(3) マイクロ波照射による核発生タイミング制御

Table 1 は種々の条件下で IBP が析出し始めるまでの待ち時間を示している。溶媒にヘキサンを用いた時は、マイクロ波照射の有無に関わらず、結晶が長時間析出しなかった。IBP 溶液の NMR 測定を行ったところ、溶液中で分子間の水素結合が確認された。従って、IBP 分子同士が水素結合により安定な二量体を形成し、結晶化の妨げになっているのではないかと推察した。

そこで、IBP 同士の水素結合形成を阻害す

Table 1 イブプロフェン結晶析出までの誘導期間

Microwave power (W)	0	100	300
Hexane	>455	>165	-
Hexane + acetone(0.35%)	27	-	>260

るために、0.35%のアセトンを溶液に添加して結晶化を行った。マイクロ波を照射しない場合、約 30 分後に結晶が析出しはじめたが、マイクロ波を照射した場合は、少なくとも 260 分間結晶化しなかった (Fig. 9)。マイクロ波照射によって IBP の極性基が振動し、結晶化が抑制されたためと考えられる。

本実験では、マイクロ波を照射することにより、飽和度 9.5 という高飽和状態まで結晶化を抑制することを初めて可能にした。このような状態から結晶化のきっかけを与えれば瞬時に大量の結晶核発生が予想され、核発生のタイミングを制御した微粒子調製の新しい手法となることが期待される。

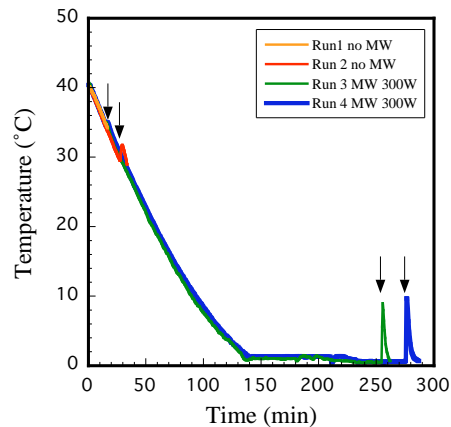


Fig. 9 マイクロ波下でのイブプロフェンの結晶化における溶液温度の経時変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ①. K. Machiya, S. Ieda, M. Hirano, and H. Ooshima, Effects of impurities on crystal polymorphism of an imidazopyridine derivative developed as a drug substance for osteoporosis, *J. Chem. Eng. Japan*, 査読有, **42**, 2009, 147-152
- ②. M. Hirano, K. Igarashi, K. Machiya, R. Tamura, H. Tue, and H. Ooshima, Relationship between crystal polymorphism and solution structure of an imidazopyridine derivative as a drug substance for osteoporosis, *J. Chem. Eng. Japan*, 査読有, **42**, 2009, 204-211
- ③. K. Machiya, K. Koga, T. Mukuta, S. Moriki, K. Kagara, and H. Ooshima, Production of spherical agglomerates of cephalosporin antibiotic crystals, *J. Chem. Eng. Japan*, 査読有, **41**, 2008, 1017-1023
- ④. K. Igarashi, M. Takiguchi and H. Ooshima, Growth mechanism of the calcium

carbonate tubes on a cation-exchange membrane, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 査読有, **116**, 2008, 111-114

〔学会発表〕(計 13 件)

- ①. 平野優、五十嵐幸一、大嶋寛, 有機化合物 BPPI の溶媒和物析出のメカニズム, 化学工学会第 74 年会, 2009.3.18, 横浜国立大学
- ②. 平野優、五十嵐幸一、大嶋寛, 有機化合物 BPPI の溶媒和物析出に及ぼすメタノール-IPA 混合溶媒組成の影響, 化学工学会姫路大会, 2008.11.18, ホテル日航姫路
- ③. Y. Nishitani, K. Igarashi, H. Ooshima, Control of Nucleation by Microwave Irradiation in Cooling Crystallization and Its Effects on Characteristics of Crystals, 8th International Conference on Separation Science and Technology, 2008 年 10 月 2-4 日, Karuizawa, Nagano Japan
- ④. K. Igarashi, N. Kubo, Y. Yamanaoka and H. Ooshima, Drawing-out Crystallization of Organic Compounds Using A ML-Scale Crystallizer, 8th International Conference on Separation Science and Technology, 2008 年 10 月 2-4 日, Karuizawa, Nagano Japan
- ⑤. 五十嵐幸一、盛岡あゆみ、山口良太、大嶋寛, 結晶の完全な再溶解を組み込んだ晶析操作, 化学工学会第 40 回秋季大会, 2008.9.25, 東北大学
- ⑥. H. Ooshima, M. Hirano, and K. Igarashi, Understandings of precipitation Behavior of crystal polymorphs and solvent-mediated transformation, 17th International Symposium on Industrial Crystallization, 2008 年 9 月 14-17 日, Maastricht, the Netherlands
- ⑦. 久保直毅、五十嵐幸一、大嶋寛, 超高速攪拌 mL-スケール連続晶析装置により得られた有機化合物結晶の形状, 化学工学会第 73 回年会, 2008 年 3 月 17 日, 静岡大学、浜松
- ⑧. 西谷祐介、五十嵐幸一、大嶋寛, イブプロフェンの結晶化に及ぼすマイクロ波照射の影響, 分離技術会年会 2007, 2007 年 6 月 7 日, 名古屋工業大学、名古屋
- ⑨. 大嶋寛, [展望講演] 結晶多形・擬多形を制御するための考え方と課題, 化学工学会第 39 回秋季大会, 2007 年 9 月 15 日, 北海道大学、札幌
- ⑩. 平野優、五十嵐幸一、大嶋寛, t-ブトキシカルボニル-L-アスパラギン (BocASN) の結晶形状に及ぼす溶媒の影響, 化学工学会第 39 回秋季大会, 2007 年 9 月 14 日, 北海道大学、札幌

- ⑪. 竹内千尋、五十嵐幸一、大嶋寛, L-アラニンの核発生挙動, 化学工学会第 39 回秋季大会, 2007 年 9 月 13 日, 北海道大学、札幌
- ⑫. 河内秀夫、大嶋寛, [優秀論文賞] 水難溶性溶媒を用いて得られる水和物擬多形結晶とそれを大量生産するための連続晶析操作, 化学工学会第 39 回秋季大会, 2007 年 9 月 13 日, 北海道大学、札幌
- ⑬. H. Ooshima, [Invited Lecture] Control of Crystal Polymorphism of Organic Compound, Symposium of Industrial Crystallization in Kyung Hee University, 2007 年 6 月 10 日, Kyung Hee University, Korea

〔図書〕(計 1 件)

- ①. 橋本光紀 監修、大嶋寛ら 21 名、シーエムシー出版、ファインケミカルシリーズ 医薬品原薬・中間体製造におけるスケールアップとトラブル対策、2008、分担 1 1 頁/総 2 6 7 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大嶋 寛 (OOSHIMA HIROSHI)

大阪市立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20112526

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

五十嵐 幸一 (IGARASHI KOICHI)

大阪市立大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：70315977