

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元 年 6 月 1 7 日現在

機関番号： 1 3 8 0 1

研究種目： 基盤研究(B) (一般)

研究期間： 2016 ~ 2018

課題番号： 1 6 H 0 3 8 8 2

研究課題名 (和文) 低振動数スペクトルに現れる有機分子結晶中不純物分子の影響解明とその利用

研究課題名 (英文) Study of impurity effects in organic crystal appearing in low frequency vibrational spectra and its application

研究代表者

佐々木 哲朗 (Sasaki, Tetsuo)

静岡大学・電子工学研究所・教授

研究者番号： 2 0 3 2 1 6 3 0

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 12,900,000 円

研究成果の概要 (和文) : 独自に開発した高周波数精度テラヘルツ分光スペクトル測定装置を用いて、医薬品原薬の中に不純物分子が混入した時の吸収周波数シフトから数十ppmの微量不純物を検出できることを示した。実際の医薬品製造では原薬分子に似た不純物分子が多く含まれるものの、これらは従来のクロマトグラフィ法が分離・識別を苦手とする対象である。本研究で創出した新規的手法は分子種に関わらず検出できるので有用である。

近年、低副作用で注目されている中分子医薬品はシャープなスペクトルを示すので、本手法を適用するに相応しい対象となることを見出した。これらの探索の中で得たデータを医薬品テラヘルツスペクトルデータベースとして公開した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テラヘルツ周波数帯の分子振動が結晶構造に敏感であるという特徴を利用して「不純物分子そのものを検出するのではなく、その分子が周りの母体結晶に与える影響として捉える」という発想の転換で新規的測定手法を創出した。医薬品中の不純物は薬害を引き起こす可能性がある切実な課題であり、例えばサリドマイド事件では同じ分子式で表される光学異性体の微量混入が原因とされたが、本研究で開発した手法では光学異性体不純物の微量検出にも成功しており、実用性の高さを示した。学術的には結晶欠陥構造解析の為に分光学的アプローチを可能とした。本研究成果で構築したスペクトルデータベースは世界各国の大学や企業からアクセスされている。

研究成果の概要 (英文) : We have shown that impurities as low as several tens of ppm in drug substance can be detected by accurate peak absorption frequency shift measurement using a high frequency precision terahertz spectroscopy system developed originally by us. Although a large part of impurity molecules contained in actual pharmaceutical production have similar species or molecular weight with drug substance, they are difficult to distinguish and detect for conventional chromatography methods. The new method developed in this study is useful because it can be detected regardless of the molecular species. Also, we have found that Middle Molecular Weight (MMW) pharmaceuticals that are attracting attention because of their low side effects show sharp spectra, and thus are suitable targets for applying this method. The data obtained in this work were released as a Terahertz spectral database for pharmaceuticals.

研究分野： 分光学

キーワード： 微量不純物検出 テラヘルツ分光 格子欠陥

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) テラヘルツ周波数帯の分子振動は分子固有の特徴的なスペクトルを持つことから、指紋スペクトルとして物質の検知識別に用いることができることが知られており、例えば医薬品製剤中の成分の定量や結晶形の差異、更にその空間分布を得ることを目的とした研究開発が行われていた。しかしながら医薬品原薬に異物が混合された場合、原薬と異物のスペクトル強度比を比較する従来の検出・定量法の検出下限は高々1%程度であり、現実の医薬品製造工程で求められる感度には及ばなかった。いっぽうで、テラヘルツ周波数帯の分子振動の帰属解明はほとんど進んでおらず、結晶中分子振動は周期境界条件を用いた DFT 理論による量子化学計算と測定スペクトルを照合することが現実的な手法と考えられる状況の中で、研究代表者のグループはその手法を確立させていた。

(2) テラヘルツ分光スペクトル測定のためのハードウェアとして、研究代表者は GaP 結晶中の差周波発生法による広帯域・連続波テラヘルツ分光スペクトル測定装置を独自に開発していた。具体的にこの装置の性能は、帯域 0.6 ~ 6.0 THz、周波数分解能 8.0 MHz、周波数精度 3 MHz であり、つまりほぼ 6 桁の精度をもっているため「テラヘルツレーザー分光スペクトル測定」に相当すると考えられていた。しかしながら、一般に医薬品のような有機分子を室温で測定するとき、その吸収線幅は 0.1 ~ 1 THz 程度となることが多く、学会の一部からは 6 桁の精度の意義を疑問視されていた。

2. 研究の目的

アミノ酸結晶のテラヘルツスペクトルを室温で計測するとき、故意に 5 ~ 15% 程度の不純物を故意に混入させると、吸収線が混入量に依存して低周波数にシフトすることを観測・報告していた。このときのシフト量は 0.2% / GHz 程度であったので、シャープなスペクトルを示す測定対象を選び、高周波数精度の分光スペクトル測定が実現できれば、実用上有意義な ppm オーダーの極微量不純物を検出する非破壊測定が実現できると考えて、この実証を本研究の目的のひとつとした。

更に、そもそもなぜ周波数が低周波数にシフトするのかという課題が残っていた。一般論としてテラヘルツ周波数領域の分子振動は分子間力の影響が強く現れるので結晶構造に敏感であると考えられる。不純物分子の混入や格子欠損などの結晶欠陥が存在した場合、母体結晶の基本振動が阻害されて吸収線が周波数シフトすることが考えられるので、これを証明するため、精密なテラヘルツ分光吸収スペクトル測定と理論計算の照合を目指した。

3. 研究の方法

専用の吸収周波数シフト計測システムを開発して不純物検出感度を確かめた。予定通りアスパラギンー水和物結晶に対し、アスパラギンに非常に近い分子構造・分子量を持つアスパラギン酸分子を微量混入不純物として採用した。特に従来は実現不可能とされてきた医薬品製造において求められる ppm オーダーの不純物検出感度の可否を確かめることとした。

格子欠陥が THz スペクトルに与える影響(周波数シフト)のメカニズムを解明するために、THz 分光スペクトル測定、X 線回折 (XRD) 測定、及び DFT 計算を同時に適用できる約 10% 程度の不純物を添加する単結晶を作成して解析を実施する。この場合も上記と同じく、まずは測定対象試料としてアスパラギンー水和物を採用した。また、実際に医薬品製造時に典型的に現れる残存して問題になるケースの典型例として、光学異性体分子が微量混入することを想定し、L- (投稿中につき名称非開示) に D 型が混入するモデルで測定して周波数シフトを評価した。

本項目は当初の予定にはなく、研究途中で得られた新たな知見に基づく発展応用研究であるが、シャープな吸収線を示す対象として、分子量が 400 ~ 2,000 程度と大きく中分子医薬品と呼ばれる新しい医薬品群が相応しいことを見出した。このような医薬品の探索と低温測定の実施、更にこの探索中に得られた医薬品スペクトルは XRD スペクトルと組み合わせでデータベース構築し、公開することとした。

4. 研究成果

微量不純物の検出

アスパラギンー水和物 (L-asparagine monohydrate $C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$) を 10K で測定することで、シャープなテラヘルツ分光吸収スペクトルが得られたが、2.7 THz 以上は吸収線が密集するために分離できなかった。明瞭に分離され、その吸収周波数を正確に評価できる 3 つのピークについて評価することを決定し、アスパラギン水溶液中にアスパラギンにアスパラギン酸 (L-aspartic acid $C_4H_7NO_4$) を 0.005 ~ 12.5% の範囲で混入させ、再結晶させて試料を得た。いずれの吸収線も不純物の量に依存して吸収周波数の値が変化する様子が確認できたが、最も感度高く変化が確認できたのはピーク 2 であった。この様子を図 1 に示す。図中には横軸にアスパラギン酸の水溶液中での含有量を取り、縦軸を中心周波数としてプロットした挿入図を示している。この範囲では不純物量と中心周波数がほぼ比例しており、4.51 GHz/% の感度が得られており、実際に 500 ppm を検出している。分光測定装置の最高精度は 3 MHz であるので 0.001 % (= 10 ppm) 程度の検出限界と見積もることができるが、実際には温度安定性の限界や吸収線幅が GHz オーダーであるために 50 ppm 程度が現状の検出下限となった。このような高い検出感度が得られる理由は、従来法では図 1 左図に示すように不純物分子を直接検出しようとしてい

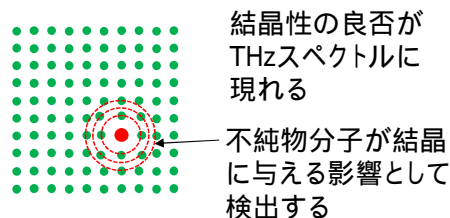
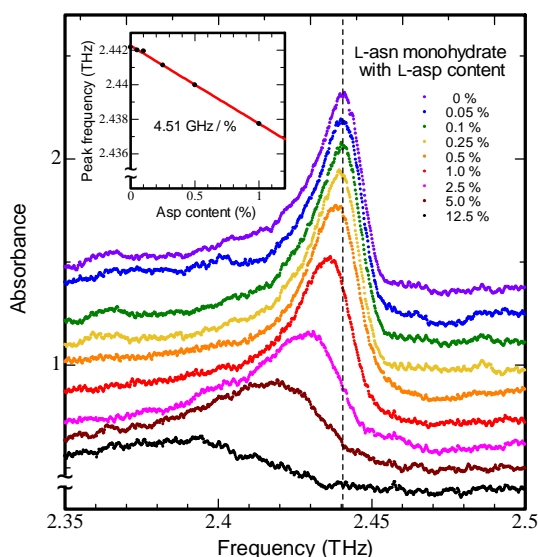


図 1 (左)不純物混入による周波数シフト．
挿入図は感度を表している．
(右)微量不純物検出のイメージ図

のに対し、テラヘルツ分光測定は分子そのものというよりも分子が構成している結晶の結晶性が吸収スペクトルとして現れるので、混入不純物を検出する際に不純物分子を直接検出するのではなく、図 1 右図に示すように不純物分子が母結晶に与える影響として検出することで高感度な検出が可能となっている。本手法の検出限界と見積もられた 50 ppm は不純物検出に一般的に用いられている液体クロマトグラフィー (LC) 法の検出限界には及ばないものの、LC 法が苦手とする“類似化学種”や“近接分子量”の分子について定量が可能という重要な特徴を持っている。実際の医薬品中不純物で多いのは、医薬品有効成分 (API) の原材料、副生成物、中間体、分解生成物などであり、これらはまさに API に対して類似化学種、近接分子量の分子となる。つまり、LC 法が苦手とする対象を補完する新しい微量不純物計測法として期待できる。

不純物分子 (結晶欠陥) がテラヘルツ吸収スペクトルに与える影響の解明

上記の実験において特に予想外で興味深い結果として、不純物に対してピーク 1、2、3 の反応が大きく異なることが挙げられる。ピーク 1、2、3 の起源が異なるために混入した不純物分子が与える影響も一様ではないと考えられる。このことは実際に DFT 理論による量子化学計算によって求めた分子振動でも得られており、この計算によれば最も低周波に現れる 3 つの振動モードは xyz 3 方向それぞれの併進モードである。(図 2 はその計算から得られた振動モードを示すが、実際はアニメーションファイルであるので下記のリンクを参照されたい。

https://www.rie.shizuoka.ac.jp/~thz/shizuoka_univ_sasaki_lab_database/Calculation_amino-acids/Calc_PBE0_L-Asparagine_monohydrate/index.html) つまり、ここで混入した不純物分子は特に 1 つの方向の振動を妨害していることを意味している。もしも別の分子が混入すれば、それぞれのピークに与える影響が変化するので、この影響の差から不純物分子種を特定できる可能性があることになる。微量不純物の定量検出だけでなく、定性分析ができることは研究開始前には想定しておらず、次につながる新たな着想が生まれた。

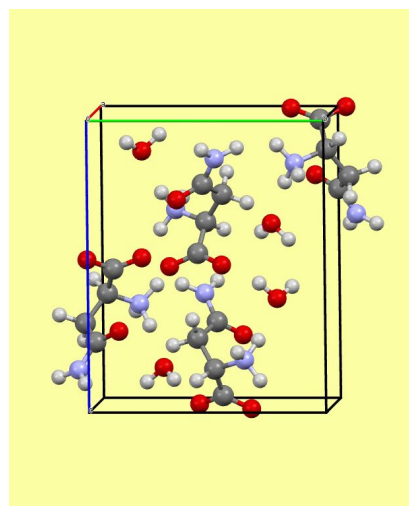


図 2 アスパラギンー水和物の
テラヘルツ帯振動モード

高速精密吸収周波数シフト計測システムの開発

吸収周波数を精密に測定して周波数シフト量を高速に検出するために、位相検波の技術を利用した測定システムを構築することを目的として、周波数変調が可能な赤外励起レーザーを導入して、測定周波数帯域を制限した周波数変調テラヘルツスペクトル測定装置を構築した。周波数変調はファイバレーザーのファイバブラッググレーティング (FBG) を温度変調してその伸縮を利用するものである。実際に約 50GHz の変調を確認し、周波数シフト計測専用機器は実現した。しかしながら、ファイバレーザーの高出力という特徴を得るためにはどうしても線幅は 2 ~ 3 GHz が限界であり、これは想定通りであったものの、同時に並行に進めた高感度検出探索の結果、実用には予想以上の周波数精度がハードウェアに求められることが判明したため、目標とする測定装置の分解能を変更して設計を進めることとなった。ダブルグレーティング方式などを試したが、現状の技術では実現は難しいことがわかった。

中分子医薬品に現れる鋭いテラヘルツ分光吸収スペクトルの観測

の結果から、よりシャープな吸収線が得られる対象物質があれば、良好な検出限界が達成できると考えられる。主に医薬品を対象にそのような分子を探索する中で、分子量が 400 を超えるような中分子量分子結晶で、小分子結晶よりもむしろシャープな吸収線が多数観測できることを見出した。今までに確認している医薬品としては、アモキシシリン (amoxicillin trihydrate, $C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$, MW = 419.45)、アトルバスタチンカルシウム (右図, atorvastatin calcium trihydrate, $C_{66}H_{68}CaF_2N_4O_{10} \cdot 3H_2O$, MW = 1209.41) などがある。例えばアモキシシリンでは 10 K での吸収線幅が 4.7 GHz のシャープな吸収線が観測され、更に未公開物質 A では約 1 GHz と非常にシャープな吸収線が観測されているが、従来分子を構成する原子の数 (分子量) が大きくなると自由度が増すために線幅は広くなるということが定説であったので、この定説を覆す重要な発見となった。今まで観測されていなかった主な理由は室温測定が中心であることと、測定装置の分解能不足である。1 GHz の線幅を正確に計測できる装置は他にはない。

尚、このような大きさの分子量はちょうど中分子医薬品と呼ばれ、その分子の大きさゆえ細胞侵入などの選択性が高く、副作用の少ない医薬品として期待されている。合成で大量生産可能なこれらの医薬品は、近年開発が活発化してきた次世代の新薬として今後一層のニーズが見込まれている。次世代医薬品の評価装置としての利用も視野に入れることができる。

の結果で示したように、不純物の定性分析に求められる多くの情報があるほど分子を特定しやすい。つまり周波数シフトが測定できる吸収線の数が多いほど望ましいが、テラヘルツ分光スペクトルで観測できる吸収線数は分子を構成する原子数に比例するので、これら中分子医薬品では数多くの吸収線が観測できるので、不純物検出にも相応しい対象である。

テラヘルツ医薬品データベースの構築と公開

不純物検出に相応しい対象医薬品を探索する中で、多くの医薬品のテラヘルツスペクトルを得たので、これを医薬品テラヘルツスペクトルデータベースとして構築して公開した。図 4 にスペクトルデータ例を示すが、日本薬局方に掲載されている原薬に対応する試薬など約 300 種類を超える医薬品成分に対する所蔵量で、低温を中心とした温度依存スペクトルとすると共に、全て XRD スペクトルデータを 1 対 1 で対応させて結晶構造を確定させていることで、医薬品の分析・評価に用いる際の基礎データや、分子振動帰属解析の際に量子化学計算の結果と比較対照する実測データとして世界中の大学、企業から閲覧され好評を得ている。

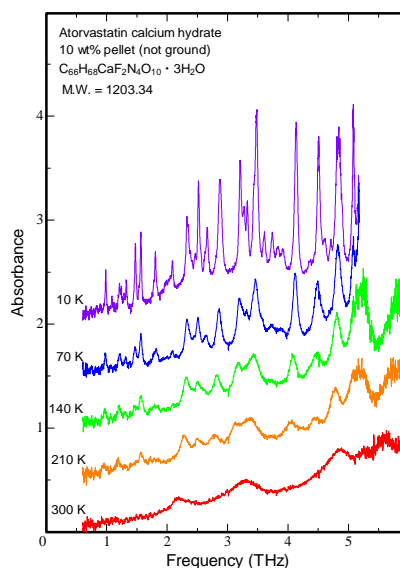


図 3 アトルバスタチンカルシウム

3 水和物のテラヘルツ分光スペクトル温度依存性

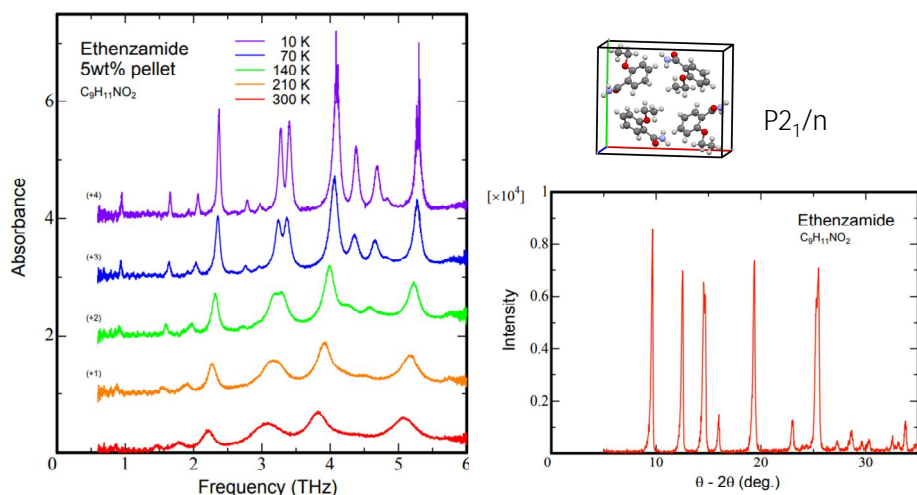


図 4 スペクトルデータベースの例

(左) THz スペクトル温度依存性 .

(右) XRD スペクトルと結晶構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Tetsuo Sasaki, Tomoaki Sakamoto, Makoto Otsuka, "Sharp Absorption Peaks in THz Spectra Valuable for Crystal Quality Evaluation of Middle Molecular Weight Pharmaceuticals", J Infrared Milli Terahz Waves 39, 828-839 (2018) <https://doi.org/10.1007/s10762-018-0494-2> (査読有)
2. Tetsuo Sasaki, Tomoaki Sakamoto, Makoto Otsuka, "Detection of impurities in organic crystals by high-accuracy terahertz absorption spectroscopy", Anal. Chem. 90, 3, 1677-1682. (2018) <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03220> (査読有)
3. Tetsuo Sasaki, Tadao Tanabe, and Jun-ichi Nishizawa, "Frequency Resolution and Accuracy Improvement of a GaP CW THz Spectrometer", Recent Global Research and Education: Technological Challenges: Proceedings of the 15th International Conference on Global Research and Education Inter-Academia 2016 (Advances in Intelligent Systems and Computing Vol.519), 2016 p.33-38 https://doi.org/10.1007/978-3-319-46490-9_5 (査読有)
(他 2 件)

〔学会発表〕(計 26 件)

1. Tetsuo Sasaki, Tomoaki Sakamoto, Makoto Otsuka, "Quantitative impurity measurement in pharmaceuticals by THz laser spectrometer", PITCON 2019 Philadelphia, USA, 2019.3.17-21.
2. Tetsuo Sasaki, Tomoaki Sakamoto, Makoto Otsuka, "Quantitative Impurity Measurement In Organic Crystals By Precise Measurements Of THz Absorption Frequencies", 43rd International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves (IRMMW-THz 2018), Nagoya, Japan, 2018.9.10 - 9.14
3. Tetsuo Sasaki, Tomoaki Sakamoto, Makoto Otsuka, "Evaluation of α -Cyclodextrin Hexahydrate Crystal by High Accuracy Terahertz Spectroscopy", ICS2018, 2018.4.29, Sophia Univ., Tokyo
4. (Invited Keynote Talk)Tetsuo Sasaki, Tomoaki Sakamoto, Makoto Otsuka, "Continuous Wave Gallium Phosphide THz Spectrometer applied for Pharmaceutical Industry", 8th International THz-Bio Workshop, (THz-BIO2017), 2017.10.4-6, Frascati, Italy
5. Tetsuo Sasaki, Tadao Tanabe, Jun-ichi Nishizawa, "Frequency Accuracy and Resolution of a GaP Continuous-Wave Terahertz Spectrometer", Proceedings of 41st International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves (IRMMW-THz 2016), Copenhagen, Sep. 29 (2016)
6. Tetsuo Sasaki, Tadao Tanabe, Tomoaki Sakamoto, Jun-ichi Nishizawa, "CW THz Signal Generator based on DFG in GaP and its Applications for Spectroscopy," BIT's 5th Annual World Congress of Advanced Materials-2016 (WCAM-2016), June 6-8., Chongqing, China
(他 10 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
THz spectral database for Pharmaceuticals
<https://www.rie.shizuoka.ac.jp/~thz/database/>

佐々木研究室の研究内容 「微量不純物検出・定量」
<https://www.rie.shizuoka.ac.jp/~thz/HR-THz.html>

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：坂本 知昭

ローマ字氏名： Sakamoto Tomoaki

所属研究機関名：国立医薬品食品衛生研究所

部局名：薬品部

職名：室長

研究者番号（8桁）：40311386

研究分担者氏名：大塚 誠

ローマ字氏名： Otsuka Makoto

所属研究機関名：武蔵野大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：90160548

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。