

顕微レーザーラマンを用いた ハイスループット結晶構造解析

キーワード

顕微レーザーラマン、ハイスループット、結晶構造解析、HTC、医薬品、結晶多形

はじめに

服用薬は、固体のものが製剤市場のほとんどを占めています。その理由は貯蔵安定性、搬送の容易さ、カプセル、タブレット、ゲル・キャップおよびパッチのようなさまざまな形態のパッケージにできるからです。多形とは分子の結晶の安定性やその状態を意味します。異なる結晶形は、薬理的固体投与量において特性の違いを示し、その特性には生物学的利用、溶解度、吸収の速度、持続時間、安定性、生産性、およびプロセスを含んでいます。多形の状態に影響を及ぼす要素は、溶剤、再結晶レート、塩の選択、および温度などがあります。多形の状態を知ることは、開発中の化合物の製造状態を完全に特徴づけるために非常に重要です。

製薬メーカーでは、現在ハイスループット結晶構造解析 (HTC) と呼ばれる手法で、多形開発の初期段階で生産性を上げるべく、主として96および384ウェルプレートを用いてスクリーニングが行われています。これまで、HTCには粉末X線回折と熱分析が使われてきましたが、新しい実験手法が強く望まれています。

HTCは、どのような分析方法においても以下の測定基準を満たす必要があります。

- ・ 分子構造の違いに敏感である
- ・ サンプルを非破壊で測定できる
- ・ 迅速である
- ・ 少量のサンプルで測定できる

ラマン分光は、上記の測定基準を満たす理想的な測定手法であり、自動化された装置の開発により、急速にHTCに不可欠なツールになりました。ラマン分光は、他の分析手法と比較していくつかの重要な利点があります。

- ・ 分子振動を測定するため、分子構造の違いに敏感である
- ・ サンプルの前処理が不要で、非破壊で測定できる
- ・ 粉末X線回折や熱分析と比べ、高速である
- ・ 数 μm の微小サンプルが測定できる

さらに電動ステージを装備する顕微ラマンシステムを利用することで、スクリーニングに適した自動測定を行うことが可能です。ここでは、ハイスループット結晶構造解析のニーズを満たすべく設計された顕微レーザーラマンとその応用例を紹介します。

装置

図1にThermo Scientific™ Nicolet™ Almega™ XR分散型顕微レーザーラマン装置を示します。今回の測定には、633 nmおよび780 nmの無偏光レーザーを用いました。対物鏡は10倍、20倍、長作動距離50倍レンズ、またアレイオートメーションソフトウェアが使えるようにCCDカメラと、X-Y-Zオートステージを搭載しています。このオートステージは、最大1,536のウェルプレートに対応できるよう設計されています。



図1. Nicolet Almega XR分散型顕微レーザーラマン (長作動距離対物レンズ、高精度オートステージ、ウェルプレートアダプターを含む)。

Nicolet Almega XRシステムは、オプションでシステムクオリフィケーションにも対応し、DQ (設計の適格性確認)、IQ (据付時適格性確認)、OQ (稼動性能適格性確認) を提供することで装置の適格性確認に必要な構成を全て含んでいます。また、PQ (稼動時適格性確認) のためのツールを提供することもできます。

測定条件の設定

最初に、HTCの分析において視覚的に特徴的な結晶が特定できるよう、ビジュアルプレスクリーニングを行います。HTCの実験は通常少量のサンプルで、96、384、1,536のいずれかのウェルプレートを用います。Thermo Scientific™ OMNIC™ アレイオートメーションソフトウェアは、高速スクリーニングに対応しているだけでなく、いくつかの測定手法を選択することができます (ウェルの中心の1点測定、ウェルの複数点測定、ウェル中で場所を指定して測定)。これらの手法によりウェル中での結晶性を確認することができます。

特徴的な結晶を特定した後、より良いデータを取得するために、ラマンスペクトルの測定条件（照射時間、露光回数、レーザー波長、レーザーパワー）を各結晶に合わせて再設定します。



図2. 96ウェルプレートを用いた実験例。溶剤とイオン性を変え、各ウェルの再結晶を観察。

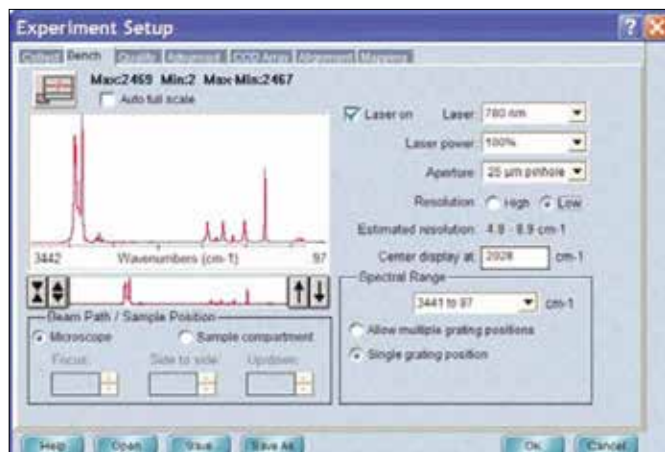


図4b. 測定条件の設定（レーザー出力など）。

測定結果

振動分光は、結晶多形のキャラクタリゼーションに有効なテクニックです。その理由は、溶媒や塩により変化した分子の幾何学構造の違いがスペクトル上で明確に観察される点にあります。特にラマン分光法では、結晶構造の変化をピークシフト、ピーク強度の変化、ピークの見分けなどで確認することができます。ただし、ラマン分光を用いて多形相を決定する際、2つの注意が必要です。1つは、励起レーザーが無偏光かどうかという点です。例えば、垂直偏光レーザーを用いたハイドロキノン針状結晶の測定で、結晶の向きを4方向に変えて測定した場合、図5に示すようにスペクトル相対強度に大きな変化が見られます。これはラマン分光による偏光測定が結晶方位や分子配向に敏感だからです。しかし、図6に示すように無偏光レーザーを利用すればスペクトル強度の相対変化もほとんど見られません。結晶多形の構造のみを比較するHTCでは、無偏光レーザーを用いなければならないことがわかります。今回の測定においても、633 nm、780 nm共に無偏光レーザーを用いました。

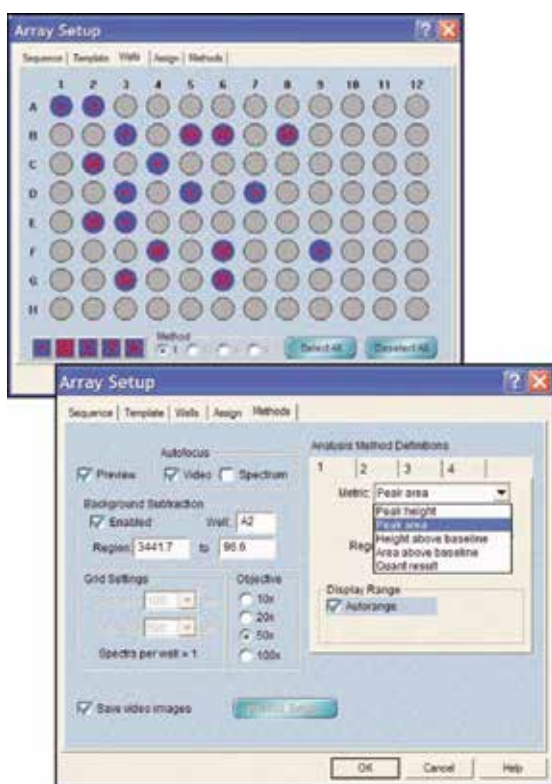


図3. OMNICアレイオートメーションソフトウェア。各ウェルに5つの測定手法（1点、多点、平均、マニュアルなど）と4つのメソッドを設定可能。

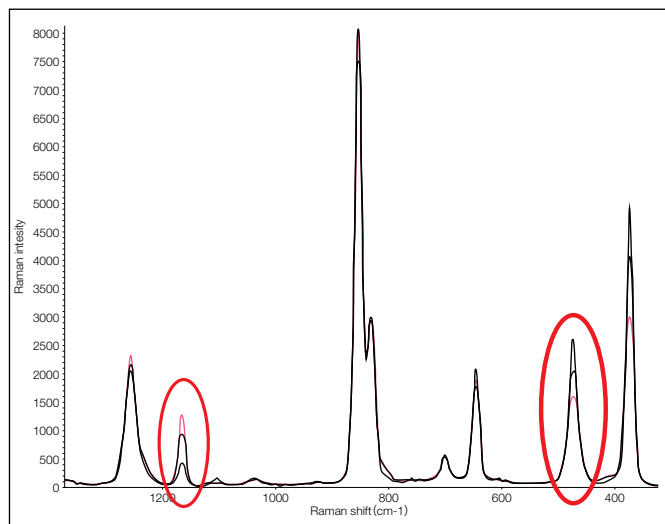


図5. 偏光レーザーによるハイドロキノンのラマンスペクトル（852 cm^{-1} でノーマライズ）。472 cm^{-1} と1,164 cm^{-1} のピークが大きく変化。

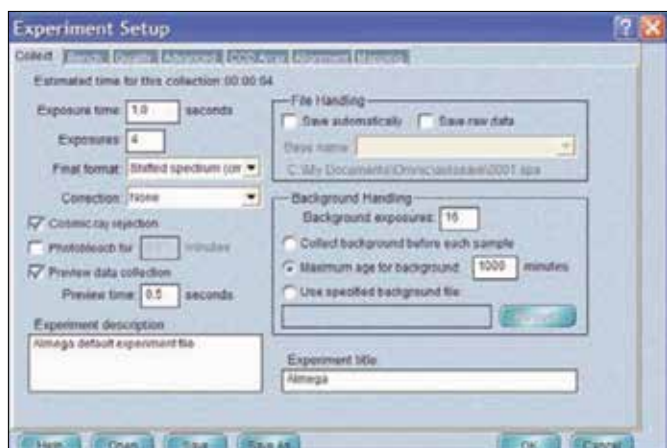


図4a. 測定条件の設定（スペクトル測定条件）。

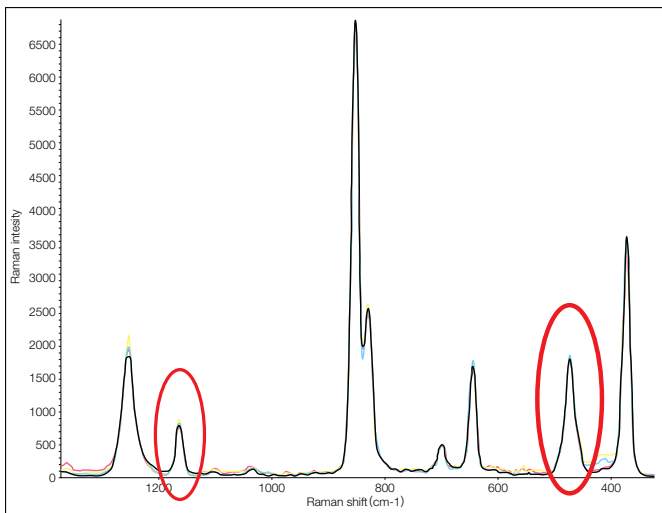


図6. 無偏光レーザーによるハイドロキノンのラマンスペクトル (852 cm⁻¹でノーマライズ。472 cm⁻¹と1,164 cm⁻¹のピークはほとんど変化しない)。

2つ目の注意は、蛍光干渉のスペクトルへの影響です。Nicolet Almega XRシステムでは、レーザーの違いによる蛍光干渉の影響を確認するために、数秒以内に2本のレーザー励振波長を自動で切り替えられます。図7、図8に5-Methyl-2-[(2-nitrophenyl)-amino]-3-thiophenecarbonitrileの多形測定を表します。1,600 cm⁻¹から1,200 cm⁻¹の領域でスペクトルが大きく変化することが分かります。

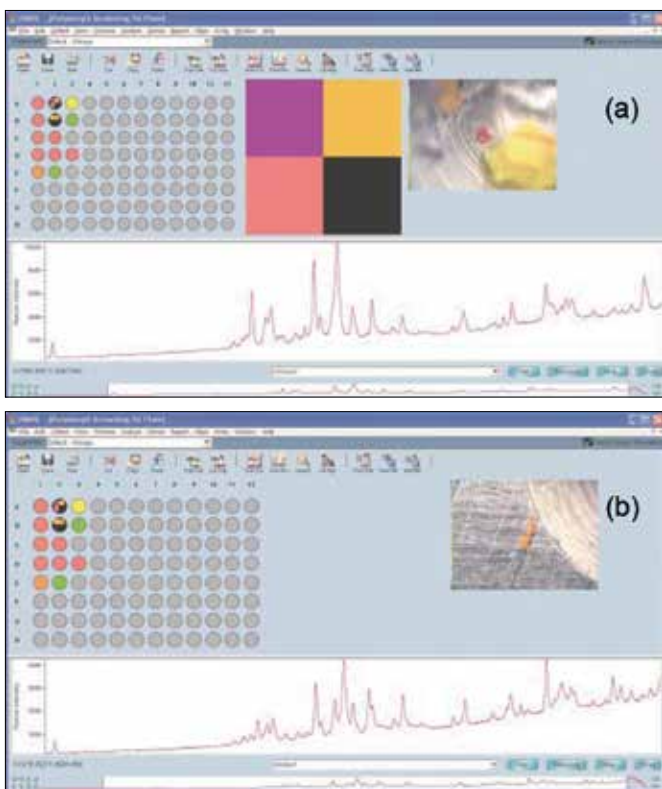


図7. 96ウェルプレートによるラマン測定の結果。
(a) : A2ウェルの赤い結晶 (フォームA) でラマンスペクトルとイメージを表示。
(b) : B3ウェルのオレンジの針状結晶 (フォームB) でラマンスペクトルとイメージを表示。

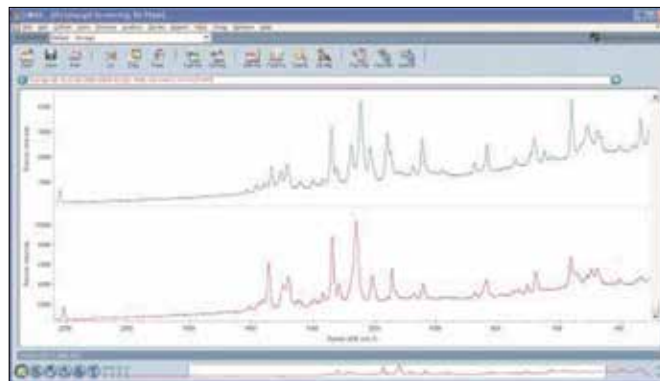


図8. 5-Methyl-2-[(2-nitrophenyl)-amino]-3-thiophenecarbonitrileのラマンスペクトル。フォーム A、Bの違いが明瞭に分かる。

測定した多くのデータの中には、異なった蛍光干渉を含むスペクトルが存在する可能性があります。データ処理において蛍光干渉は邪魔になるので、何らかの対策が必要です。OMNICアレイオートメーションソフトウェアでは、蛍光干渉の影響を取り除くために何種類かのデータ処理を適用できます。代表的な方法として、スペクトル全領域で微分を行い、蛍光干渉を除去する方法があります。特に図9に示すNorris微分は、蛍光干渉を除去すると共に、わずかなピークシフトや複合バンドの分離をより強調できるので、効果的な手法と言えます。

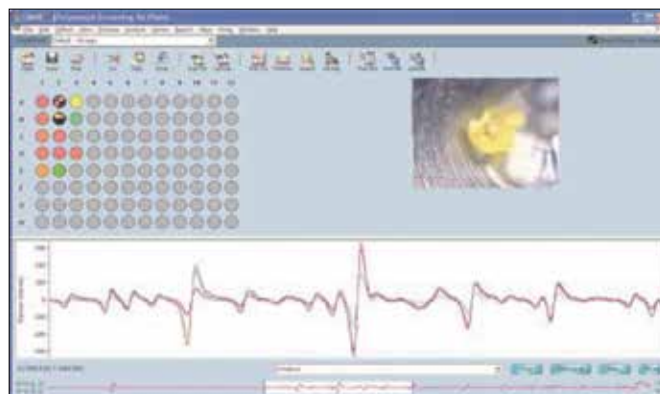


図9. 図8のスペクトルにNorris微分を行った結果。この機能によりピーク強度の変化や、わずかなピークシフトを感度よく捉えることができる。

ハイスループット結晶構造解析による測定結果の解釈

ハイスループット結晶構造解析では、短時間でより正確に多くのスペクトルの比較を行う機能を備えることが必須となります。OMNICアレイオートメーションソフトウェアは、分析におけるタスクを自動化し時間を短縮することで作業効率を飛躍的に向上させることができます。HTCの主目的は多形の変化を短時間で特定することにあるので、データ処理・解析能力が非常に重要なファクターとなります。

アレイオートメーションソフトウェアの特長は、測定したデータを、スペクトルの類似性 (相関性) に基づくクラス分けや、全体のグループ分けに用い、クラスター分析を自動で行うことができる点です。測定したデータは再処理前のデータとして保存されているので、ソフトウェアによる再分析を何回でも行えます (図10)。

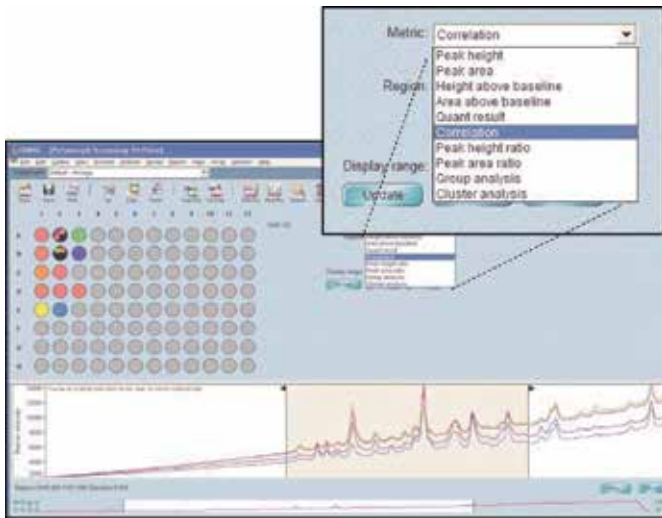


図10. A1のウェルをリファレンスとした5-Methyl-2-[(2-nitrophenyl)-amino]-3-thiophenecarbonitrileの相関解析 (1,650 cm^{-1} ~1,100 cm^{-1} の領域)。相関関係が高いウェルを赤色 (B1、C2、D1、D2、D3) で表示。

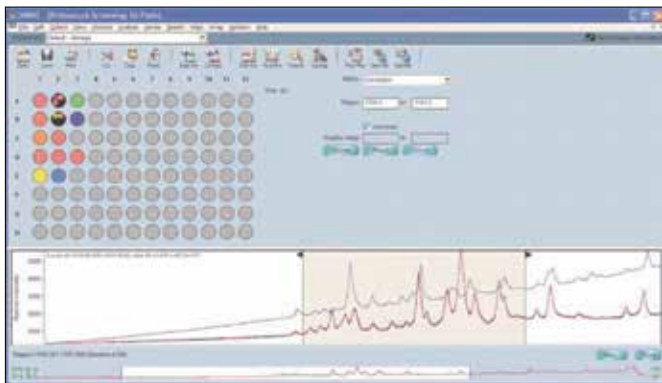


図11. 図10と同様の分析。相関関係が低いウェルを青色 (2E) と紫色 (B3) で表示 (A1、2E、B3スペクトルのオーバーレイで確認 (2EとB3は類似))。

Correlation (相関) による解析では、リファレンスとなるスペクトルに基づく相関性を求めることで、リファレンスとウェル上にあるその他のスペクトル (ウェル) の違いを色分けして表示することができます (図10、11)。

これとは別に、Group Analysis (グループ分析) による解析では、リファレンスを必要とせず、ウェル全体の相関性をソフトウェアで判断し、その類似性に基づいて色分けを行うことができます。これにより、新しい多形の判断が瞬時に行える可能性が考えられます。例えば、96ウェルプレートの手動による解析は、熟練した分析技術者であっても、数時間以上を要することがありますが、アレイオートメーションのGroup Analysisを利用することにより解析時間を最短5分にまで短縮することができます。図12は、384ウェルプレートを用いた測定例です。リファレンスデータがない状態でもグループ分けを行うことができるので、識別の自動化において、とても有力なツールとなります。



図12. バックグラウンドの蛍光干渉を除去するためにNorris微分を行いグループ分析を行った結果。3つのグループ (赤、緑、黄色) と、いずれにも該当しない21のウェル (紫色) に分類。

まとめ

ラマン測定は分子構造の違いに敏感で、サンプルを迅速かつ非破壊で測定でき、しかも少量のサンプルで測定できるという特長があります。ここに紹介した分析例より、Nicolet Almega XR 分散型顕微レーザーラマンとOMNICアレイオートメーションソフトウェア、ウェルプレートの組み合わせによる分析が、ハイスループット結晶構造解析において非常に有用なプラットフォームになることが示されました。

研究用のみ使用できます。診断用には使用いただけません。
© 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.
実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。
価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。
標準販売条件はこちらをご覧ください。thermofisher.com/jp-tc FTIR150-A2209CE

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671

Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

thermofisher.com