

Suspended-state NMR 測定による水分散中の 化粧品ナノ粒子の分子状態評価

千葉大学大学院薬学研究院

東 顕二郎

We investigated the formation and stabilization mechanisms of drug/poloxamer 407 (P407) nanosuspensions by suspended-state NMR spectroscopy. Indomethacin (IMC) and piroxicam (PXC) used as models of poorly water-soluble drugs are nonsteroidal anti-inflammatory drugs. For IMC, the three different polymorphs of γ -form, α -form and amorphous form were used to evaluate the effect of initial crystal form of drug. P407, a tri-block copolymer composed of polyethylene glycol (PEG)₁₀₁-polypropyleneoxide (PPO)₅₆-PEG₁₀₁, was used as a stabilizer. Mean volume diameter in every suspension prepared with wet-milling was 240-270 nm with unimodal size distribution. Cryogenic transmission electron microscopy images of nanoparticles obtained using γ -form IMC indicated a rhombic-plate shape. In contrast, needle-like nanoparticles were observed in the nanosuspensions of α -form and amorphous IMC. The nanoparticle obtained with PXC showed an irregular shape. Suspended-state cross polarization ¹³C NMR measurements directly detected the molecular states of drug in nanosuspensions. IMC existed in its initial crystal form when γ -form and α -form IMC were used; amorphous IMC transformed into crystalline α -form IMC. The PXC in the nanoparticle existed as the mixture of amorphous and crystalline states. Suspended-state ¹³C pulse saturation transfer NMR measurements revealed the molecular state of P407 in the nanosuspensions. P407 could only adsorb to the surface of the IMC nanoparticles because IMC existed as crystals in the GM suspension. Conversely, the larger numbers of P407 were involved in the PXC nanoparticles where some of PXC existed as amorphous state. The difference between the nanoparticle structures in the IMC and PXC systems could be a consequence of the interaction strength of each drug with P407. The peaks of the PPO chains of P407 in the spectra of GM suspensions were split at lower and higher magnetic fields. The equilibrium of P407 between micelle and nanoparticle was slower than the NMR time scale, which could stabilize the dispersion of the nanoparticles in water.

1. 緒言

近年、スクリーニング技術の発展に伴い多数の医薬品・化粧品の新規候補薬物が見出されている。一方、それら候補薬物の70%以上は難水溶性であり、その低い薬物吸収量のため薬効を最大限発揮できず、開発が断念されるケースもある。今後も、薬物の分子量の増大・化学構造の複雑化により溶解性が低い候補化合物は益々増えていくと予想される。そのため、難水溶性薬物の溶解性改善技術の開発は製剤研究における重要な課題の1つであり、これまでに、結晶形の制御、塩や共結晶、シクロデキストリン包接化合物及び非晶質固体分散体の調製などが広く適用されている。また2000年以降、薬物ナノ粒子化も溶解性改善手法として注目されている¹⁾。薬物ナノ粒子は、その界面はポリマーや界面活性剤などの安定化剤で被覆されているが、そのコア部分は主に薬物相から形成されている。薬物ナノ粒子製剤のアプリケーションとして、筋肉内投与、静脈投与、経肺投与、経皮投与、経眼投与などがあるが、最も論文報告が多くまた市販されている製品数が多いのは経口投与で

ある。薬物粒子をナノ化することにより、薬物溶解速度の向上、薬物溶解度の上昇、消化管粘膜への付着性の増加が見込まれる。これにより、薬物経口吸収性改善が期待できる。懸濁液のナノ粒子内部あるいは固液界面の薬物と安定化剤の状態を分子レベルで評価できれば、ナノ粒子製剤の処方設計及び品質評価・制御において有用な指針となる。しかし、懸濁液は液相(溶解成分)と固相(ナノ粒子)の2相からなるため、固体試料と同様に評価するのは困難である。そこで、懸濁液を乾燥して試料を固化した後、固体試料の測定法(粉末X線回折測定、熱分析、各種分光測定等)を適用して評価がなされている。しかし、乾燥後において、ナノ粒子内部あるいは固液界面にある薬物と安定化剤が懸濁状態の物性をそのまま保持しているかどうかは疑問である。NMRは、分子を構成する原子1つ1つを区別して観察する方法であり、他の測定法では得られにくい原子核レベルの情報を取得できる。また、NMRではピークの線幅や緩和時間測定などから、分子運動性に関する情報も得られる。我々は固体NMRで用いられているマジック角回転(magic-angle spinning: MAS)及び双極子デカップリング(dipolar decoupling: DD)の2つの手法を応用して(Fig. 1)、水に分散したナノ粒子中の薬物と安定化剤の分子状態を直接評価する試みを行っており、これをsuspended-state NMRと称している²⁻⁴⁾。Suspended-state NMRでは、試料の漏洩がないように工夫されたカプセル型容器に薬物ナノ懸濁液を封入し、これを固体NMRの試料管にセットする。そして、外部磁場(B_0)に対して $3\cos^2\theta - 1 = 0$ を満たす



Evaluation of molecular state of cosmetic nanoparticles dispersed in water by suspended-state NMR spectroscopy

Kenjiro Higashi

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

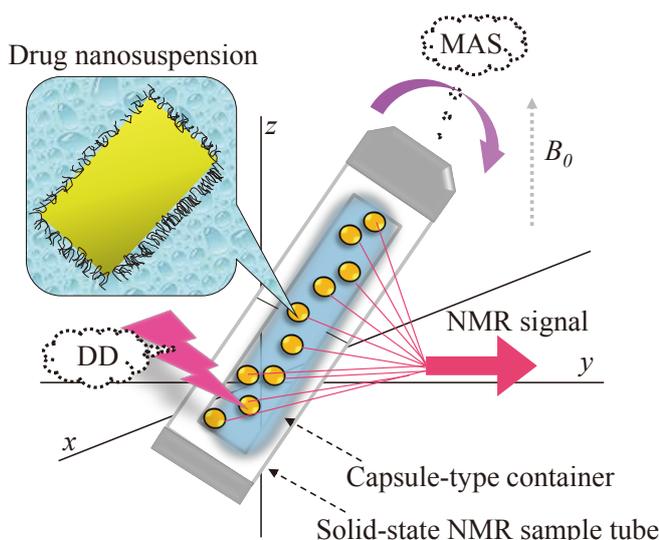


Fig. 1 A schematic representation of suspended-state NMR

$\theta = 54.7^\circ$ の角度(マジック角)で、試料管を数kHz～数十kHzで高速回転させるMASを適用する。さらに、NMR信号を取得する時に、 ^1H 核の共鳴周波数の強い高周波数のラジオ波を連続的に照射するDDを適用する。MASとDDの併用により、固体試料のスペクトルの広幅化の原因となっている化学シフト異方項及び ^1H - ^{13}C 双極子相互作用の両方を消去・軽減する。結果として、溶液NMRでは観察できない運動性の低い固体成分でも高分解能 ^{13}C NMRスペクトルの取得が可能となる。従ってsuspended-state NMRでは、懸濁液中にある運動性の低いナノ粒子のコアにある薬物や固液界面にある安定化剤のNMRスペクトルを、乾燥工程なしに直接得ることができる。

本稿では、suspended-state NMR法を用いて、湿式粉碎により調製した2種類の薬物ナノ懸濁液について評価した結果を報告する。難水溶性薬物のモデルとしてインドメタシン(indomethacin: IMC、非ステロイド性抗炎症薬)及びピロキシカム(piroxicam: PXC、非ステロイド性抗炎症薬)を用いた。IMCには7つの結晶多形が報告されている⁵⁾。ここでは、最安定形の γ 形IMCに加えて準安定形の α 形IMC及び非晶質IMCを使用し、粉碎前のIMC結晶形が湿式粉碎より得られるナノ粒子の形態やIMC分子状態に及ぼす影響を評価した。また、安定化剤として、ポリエチレンオキシド(polyethyleneoxide: PEO)₁₀₁ - ポリプロピレンオキシド(polypropyleneoxide: PPO)₅₆ - PEO₁₀₁ からなるトリブロックコポリマーであるポロキサマー407(P407)を用いた。薬物とP407を水に分散させて湿式粉碎することで、薬物ナノ懸濁液を調製した。そして、得られた薬物ナノ懸濁液中の薬物及びP407の分子状態をsuspended-state NMR測定により評価し、各薬物ナノ粒子の構造について考察した。

2. 方法

2.1. 薬物ナノ懸濁液の調製

P407を濃度50 mg/mLとなるよう蒸留水に溶解させP407溶液を得た。薬物(γ 形IMC、 α 形IMC、非晶質IMC、PXC)を仕込み濃度100 mg/mLでP407溶液中に分散し、ボルテックスミキサーを用いて3分間混合し、物理的混合物(physical mixture: PM)懸濁液を得た。PM懸濁液と直径5 mmのジルコニアボール100個を容量50 mLのジルコニア製粉碎ジャー(Verder Scientific Co. Ltd., Tokyo, Japan)に入れ、遊星型ボールミル(PM100: Verder Scientific Co. Ltd., Tokyo, Japan)により回転速度400 rpmで粉碎を行うことにより、混合粉碎物(ground mixture suspension: GM)懸濁液を調製した。

2.2. 粒子径測定

MICROTRAC 9340-UPA (MicrotracBEL Corp., Japan)を用いて動的光散乱法により、ナノ粒子の体積平均径(mean volume diameter; MV)を算出した。

2.3. 極低温透過型電子顕微鏡(Cryo-transmission electron microscopy: Cryo-TEM)測定

JEM-2100F (JEOL Co., Ltd., Japan)を用い、加速電圧120 kVでcryo-TEM測定を行った。マイクログリッド膜貼付グリッド(Cu200, Nisshin EM Co. Ltd., Japan)のフィルム被膜側をHDT-400 (JEOL Co., Ltd., Japan)により40秒間親水化処理した後、各試料液2 μL を吸着させた。過剰な溶液を濾紙で吸い取った後、液体窒素の自動供給により温度を約 -170°C にコントロールした液体エタン内で急速凍結させcryo-TEM試料とした。Cryo-TEM試料をGatan 626 cryo-holder (Gatan, Inc., CA, USA)に液体窒素中で装着し、 -170°C 以下の温度を維持してTEM測定を行った。

2.4. Suspended-state NMR測定

JNM-ECA 600 (JEOL Resonance Co., Ltd., Japan: 外部磁場強度: 14.01 T)を用い、suspended-state ^{13}C NMR測定を行った。測定シーケンスは、MAS 5 kHz条件下において、交差分極(cross polarization: CP)及びパルス飽和移動(pulse saturation transfer: PST)測定を行った。また、spinning sidebandを消去するためtotal suppression of spinning sideband測定を合わせて用いた。Suspended-state NMR測定では、MAS下における試料の漏出を防ぐため、特殊カプセル内に試料を封入した後、NMRサンプル管内に挿入した。MASによる高速スピニングの影響で、測定試料のサンプル管壁への偏析が認められた。しかし、この試料は再分散が可能であり、平均粒子径もMAS回転

前とほぼ同等であった。このことから、MASによる試料の変化は起こらないと判断し、以降の解析を行った。

3. 結果・考察

3.1. 粒子径及び形態評価

Fig. 2左に各GM懸濁液の動的光散乱法による粒子径測定結果を示す。GM懸濁液のMVは240-270 nmであり、その粒子径分布は単峰性であった。この結果より、いずれの結晶形のIMC及びPXCを用いた場合でも湿式粉碎により薬物ナノ懸濁液が形成されることが明らかとなった。一方、cryo-TEM測定の結果 (Fig. 2右)、初期の薬物結晶形及び薬物の種類に依存して得られる薬物ナノ粒子の形態は異なった。 γ 形IMCを用いて調製したGM懸濁液では、菱形板状の形態が観察された。これに対して、 α 形IMC及び非晶質IMCを用いて調製したGM懸濁液では、針状のナノ粒子が認められた。各IMC粉末について走査型電子顕微鏡測定を行った結果、 γ 形IMC結晶は菱形板状、 α 形IMC結晶は針状の形態を呈した (data not shown)。この結果より、 γ 形IMC及び α 形IMCを用いて調製した場合、それぞれの初期結晶に特徴的な形態を保持したままナノ粒子化したのに対して、非晶質IMCを用いた場合にはナノ粒子化に伴い形態が変化することが示された。さらに、PXCを用いた系ではIMCの系とは異なり、粒子の形態は不定形となり、またナノ粒子と水の固液界面にP407由来すると考えられる厚い表面層が認められた。

3.2. Suspended-state NMR測定

3.2.1 CP測定

Suspended-state NMR測定により各GM懸濁液中の薬物とP407の分子状態を評価した。Fig. 3には各GM懸濁液について、CP法を用いて測定したNMRスペクトルを示す。CP法は双極子相互作用を介して ^1H 核から ^{13}C 核へ磁化を移動させる手法である。分子運動性の高い成分は双極子相互作用が平均化されるためCPスペクトルに反映されにくいものに対して、分子運動性の低い成分はCPスペクトルに強調されて観察される。すなわち、懸濁液では運動性の高い溶解成分はCPスペクトルに反映されにくいものに対して、運動性の低い粒子成分は強調して観察される⁶⁾。 γ 形IMC及び α 形IMCを用いて調製したGM懸濁液のIMCピークは、それぞれ γ 形IMC及び α 形IMC結晶の化学シフト値と一致した。一方、非晶質IMCを用いて調製したGM懸濁液のIMCピークは、 α 形IMC結晶と同様であった。すなわち、結晶性IMCより調製したGM懸濁液では粉碎過程で初期結晶形を維持したままIMCがナノ粒子化した一方、非晶質IMCを用いたGM懸濁液ではナノ化する過程で α 形IMCへと転移して結晶化したことが明らかとなった。また、本結果より Fig. 2の cryo-TEM像で観察されたIMCナノ粒子

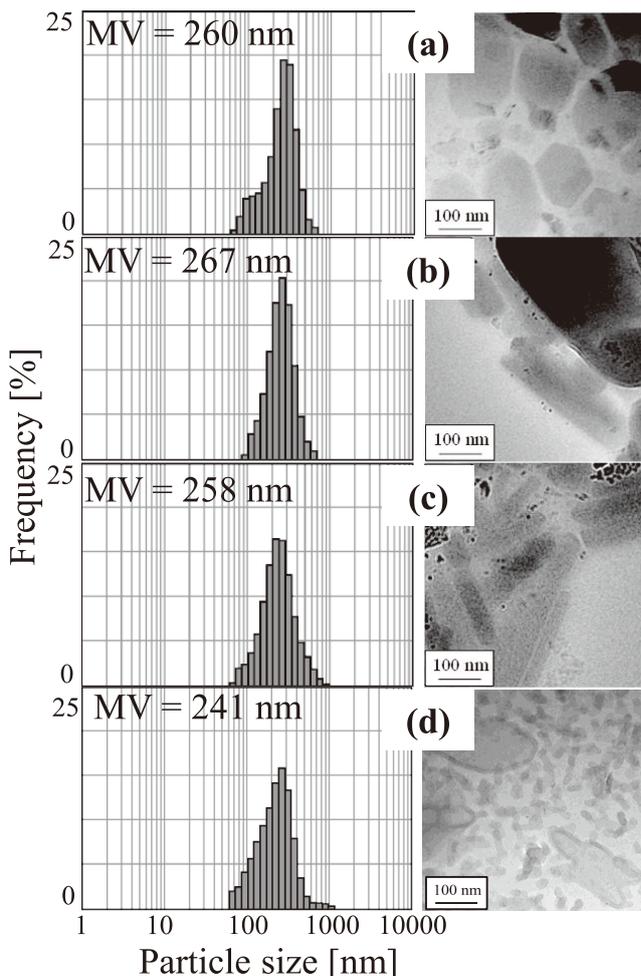


Fig. 2 (left) Particle size distribution patterns and (right) cryo-TEM images of a GM suspensions prepared with (a) γ form IMC, (b) α form IMC, (c) amorphous IMC and (d) PXC

の形態の相違が、ナノ粒子中のIMC結晶形の違いに由来することを確認できた。PXCを用いたGM懸濁液においては、PXCピークが先鋭化なピークと広幅なピークの重ね合わせとして観察された。この先鋭なピークと広幅なピークはそれぞれ結晶と非晶質状態のPXCを反映しており、GM懸濁液においてはPXCが結晶状態のみならず非晶質状態で存在することが示された。湿式粉碎により調製したナノ粒子中の薬物は通常結晶状態であることから、ナノ粒子中のPXC非晶質化は興味深い事象と言える。

さらに、いずれのGM懸濁液のCPスペクトルいずれにおいても、P407由来するピークが20及び70ppm付近に認められた。CP法は運動性の低い成分を強調して観察する手法であることから、GM懸濁液中には運動性の抑制されたP407成分が存在することが明らかとなった。すなわち、このP407ピークはナノ粒子と水の固液界面に吸着した成分あるいはナノ粒子に取り込まれた成分に由来すると考えられる。また、P407のピーク強度はPXCを用いたGM懸濁液の方が、各結晶形のIMCを用いたGM懸濁液よ

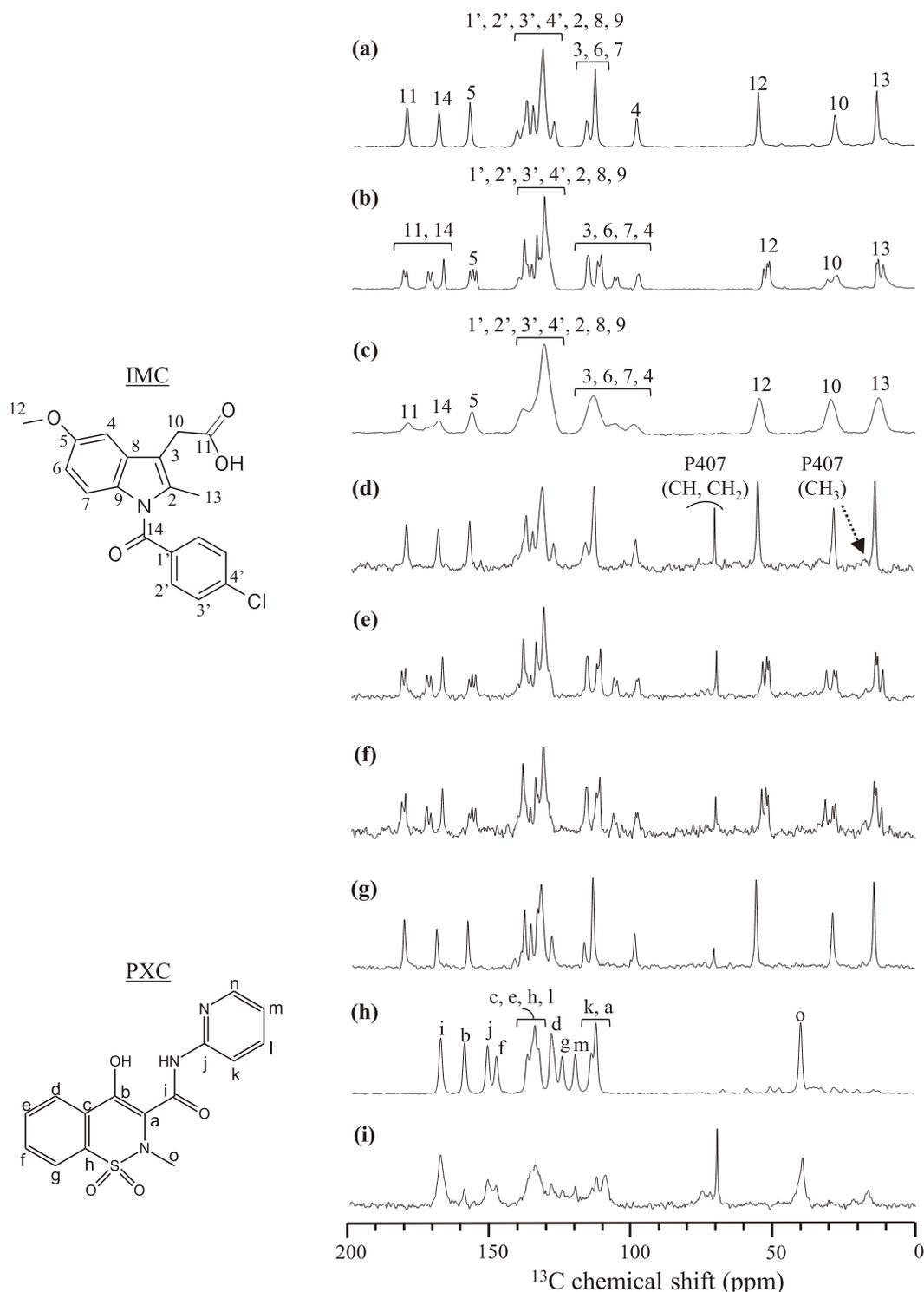


Fig. 3 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of (a) γ -form IMC, (b) α -form IMC, (c) amorphous IMC, (d) GM suspension prepared with γ form IMC, (e) GM suspension prepared with α form IMC, (f) GM suspension prepared with amorphous IMC, (g) PM suspension prepared with γ form IMC, (h) crystalline PXC, and (i) GM suspension prepared with PXC

りも顕著に大きくなった。このことから、PXCを用いたGM懸濁液ではIMCを用いたGM懸濁液と比較して、より多くのP407がナノ粒子成分として存在していると考えした。

3.2.2 PST測定

各GM懸濁液中に存在するP407の分子状態をより詳細

に評価する目的で、PST法による評価を行った。PST法では、運動性の高い成分(溶解成分)及び低い成分(ナノ粒子成分)の両方がスペクトル上に観察される。Fig. 4に、 γ 形IMC/P407 PM懸濁液と各GM懸濁液のスペクトルを、70 ppm 付近のPEOのメチレンピークに対してノーマライズした結果を示す。PM懸濁液のスペクトルでは、PEO

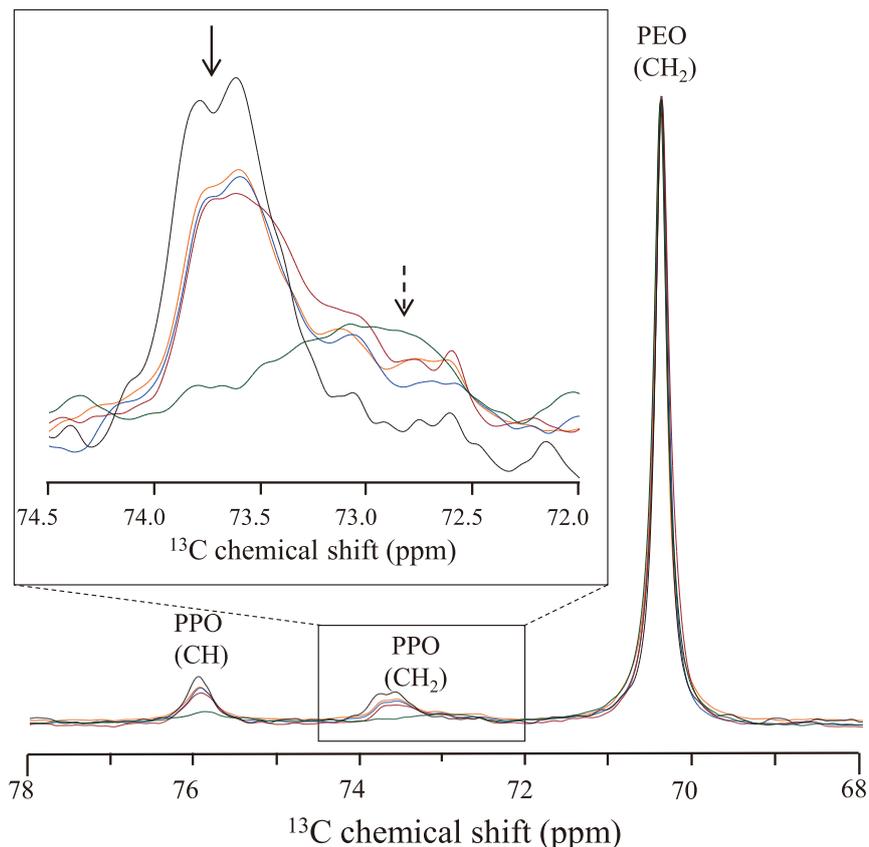


Fig. 4 ^{13}C PST/MAS NMR spectra of GM suspension prepared with γ form IMC (orange line), GM suspension prepared with α form IMC (blue line), GM suspension prepared with amorphous IMC (red line), PM suspension prepared with γ form IMC (black line), and GM suspension prepared with PXC (green line). Solid and dotted arrows indicate the P407 forming polymeric micelles, and immobilized on the surface of nanoparticles, respectively.

鎖と PPO 鎖のメチレンピークは共に先鋭であった。PM 懸濁液においては P407 はほぼすべてが高分子ミセルとして存在しており、その速い等方性回転（相関時間 10 μs ）のため、先鋭なピークが観察されたと考えられた⁶⁾。GM 懸濁液においては、PEO ピークの線幅と化学シフトは PM 懸濁液のものとはほぼ一致した。GM 懸濁液においては P407 は薬物ナノ粒子 (200-300 nm) と高分子ミセル (10-20 nm) の両方に存在する。薬物ナノ粒子と高分子ミセルでは、そのサイズ及び拡散速度は大きく異なるにも関わらず、PEO ピークの形状は同程度に先鋭であった。この理由として、ナノ粒子の PEO 鎖は主にナノ粒子と水の固液界面に存在しており、水和層を形成しているため分子運動性が高く、高分子ミセルの PEO 鎖と同様の分子状態にあることが考えられる⁷⁾。これに対して、74 ppm 付近の GM 懸濁液中の PPO のメチレンピークでは、低磁場側の高分子ミセルに由来するピーク（実線矢印）に加えて、高磁場側にナノ粒子成分である P407 に由来すると考えられる肩ピーク（破線矢印）が観察された。PPO 鎖のピークが低磁場側と高磁場側に分裂して観察された結果より、P407 のナノ粒子と高

分子ミセル間の吸着・脱着は NMR のタイムスケールよりも遅いことが示された⁶⁾。溶液中における粒子への吸着は高分子と低分子の界面活性剤で大きく異なる。低分子界面活性剤では粒子界面とミセル間での吸着・脱着は極めて速い。一方、高分子界面活性剤では、多数あるモノマーが粒子界面でそれぞれ相互作用するため、高分子鎖の部分的な吸着・脱着は起きるものの高分子鎖全体の吸着・脱着は抑制される⁸⁾。特に、粒子がナノサイズの場合には、高分子鎖の脱着は顕著に抑制される。よって、本 GM 懸濁液においても、P407 の疎水部である PPO 鎖のモノマーがそれぞれナノ粒子中で薬物と多数の疎水性相互作用を形成しており、この疎水性相互作用が協同的に働く。そのため、ナノ粒子に強く吸着した P407 の脱着は極めて抑制されていると推察された。

Fig. 5 に suspended-state NMR より考察した IMC/P407 GM 懸濁液 (Fig. 5a) 及び PXC/P407 GM 懸濁液 (Fig. 5b) の模式図を示す。湿式粉碎により、 γ 形 IMC を用いた GM 懸濁液では γ 形 IMC ナノ結晶が、 α 形 IMC 及び非晶質 IMC を用いた GM 懸濁液では α 形 IMC ナノ結晶が形成された。

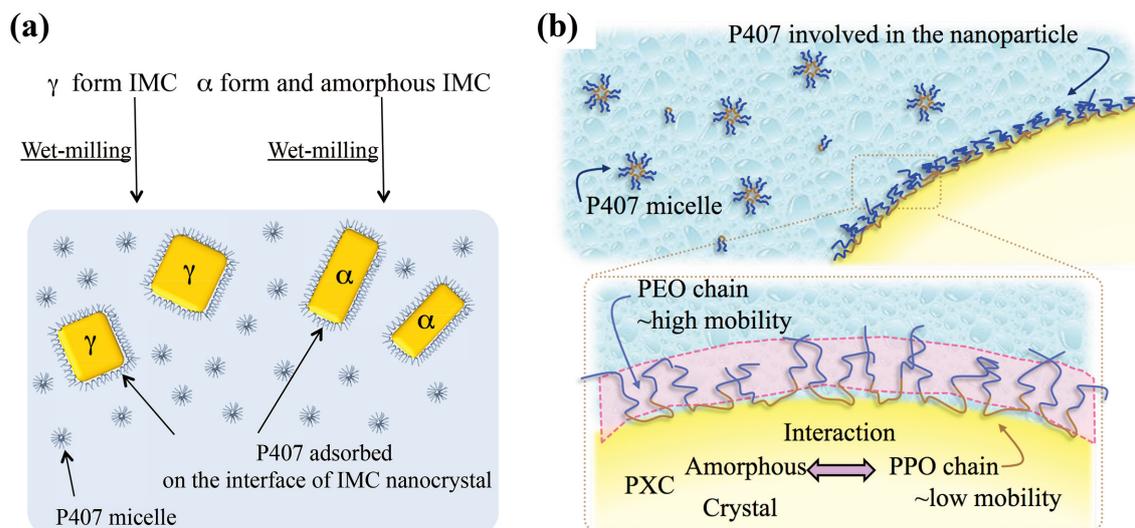


Fig. 5 Schematic representations of (a) IMC/P407 and (b) PXC/P407 GM suspensions

各IMC/P407 GM懸濁液中においては、液相成分としてP407の高分子ミセル、固相成分としてIMCナノ結晶及びその結晶界面に吸着したP407が存在している。IMCナノ結晶界面に吸着したP407は、疎水性のPPO鎖の疎水性相互作用によりIMC結晶に強く相互作用する一方、親水性のPEOの水和層形成によりIMCナノ結晶の分散安定化に寄与していると考えられる。PXC/P407 GM懸濁液でも、IMC/P407 GM懸濁液と同様に、液相成分であるP407高分子ミセル及び固相成分であるPXCナノ粒子からなる。そして、固相のP407は主にナノ粒子界面近傍に存在し、親水性の高いPEO鎖を液相側に突き出し、また疎水性の高いPPO鎖は粒子界面で固定された構造を形成する。IMC/P407 GM懸濁液ではIMCが結晶で存在するのみであるのに対して、PXC/P407 GM懸濁液ではPXCの結晶と非晶質が共存する。PXCの非晶質は非常に不安定であり、室温でも速やかに結晶化する。したがって、水溶液中でPXC非晶質が単独で安定に存在するのは困難で、P407がPXC非晶質形成に寄与していると予想される。ナノ粒子界面において、P407のPPO鎖が粒子内部を向いていることから、このPPO鎖がPXCと相互作用を形成し、PXC非晶質を安定化していると考えた。IMCよりもPXCの方がPPO鎖との分子間相互作用が強い。そのため、より多くのP407がナノ粒子に取り込まれ、ナノ粒子中の一部のPXCが非晶質化したと推察した。

4. 総括

Suspended-state NMRにより、湿式粉碎により調製したIMC/P407及びPXC/P407ナノ懸濁液中の薬物の結晶形やナノ粒子に吸着したP407の分子状態を評価できた。Suspended-state NMRは、薬物ナノ懸濁液中の薬物と添加剤について原子レベルの詳細な情報が得られる。一

方、MASによる遠心力の影響を考慮する必要があり、またNMRの感度の低さから測定に時間を要し、適用が薬物濃度の高い薬物ナノ懸濁液のみに限られる。そのため、今後のsuspended-state NMRの汎用的な応用については更なる発展が必須である。しかし、近年のNMR技術の目覚ましい発展を背景に、将来的には薬物ナノ懸濁液の物性評価法として確立され、様々な薬物ナノ懸濁液の分子状態・界面構造評価に用いることができると見込んでいる。そして、効率的な高品質の薬物ナノ粒子製剤の処方設計及び精密な品質評価・管理に貢献するものと期待している。

(引用文献)

- 1) M. Malamataris, K. Taylor, S. Malamataris, D. Douroumis, K. Kachrimanis, *Drug Discov. Today*, 23, 534-547 (2018)
- 2) J. Zhang, K. Higashi, W. Limwikrant, K. Moribe, K. Yamamoto, *Int. J. Pharm.* 423, 571-576 (2012)
- 3) Y. Kuroiwa, K. Higashi, K. Ueda, K. Yamamoto, K. Moribe, *Int. J. Pharm.* 537, 30-39 (2018)
- 4) Y. Hasegawa, K. Higashi, K. Yamamoto, K. Moribe, *Mol. Pharm.* 12, 1564-1572 (2015)
- 5) K. Higashi, K. Ueda, K. Moribe, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 117, 71-85 (2017)
- 6) C. Mayer, *Ann. R. NMR S.* 55, 205-258 (2015)
- 7) K. Abe, K. Higashi, K. Watabe, K. Kobayashi, W. Limwikrant, K. Yamamoto, K. Moribe, *Colloids Surf. A.* 474, 63-70 (2015)
- 8) K. Sigfridsson, U. Skantze, P. Skantze, S. Johansson, I. Grant, B. Smedsrød, B. Fuglesteig, K. Elvevold, L. Lindfors, *Int. J. Pharm.* 518, 29-40 (2017)