

非侵襲的測定技術に基づく食品成分の溶解性・吸収性・安定性に及ぼす 塩の影響の評価

森部 久仁一, 東 顕二郎, 植田 圭祐

千葉大学大学院薬学研究院

概要 機能性食品や医薬品の金属塩を調製した際、水の吸着や潮解という問題が生じる場合があり、それが製剤中の薬物の安定性に大きな影響を及ぼす。そのため、製剤中における塩の分子状態を正確に評価することは、製剤の品質を維持・管理する上で非常に重要である。本研究では、塩の分子状態を検討するため、新しい物性評価法として multiple-quantum magic angle spinning (MQMAS) NMR 測定を行い、その有用性を検討した。モデル化合物として、4つの水和物が報告されているナプロキセン Na (SN) を用いた。SN 無水物における ^{23}Na -MAS NMR スペクトルでは、ピークが核四極子相互作用による影響で非対称及び線幅が広くなり、ピークの数不明瞭であった。一方、SN 無水物の ^{23}Na -MQMAS NMR スペクトルでは、ピークが明瞭に2つのサイトとして分離されているのが観察され、SN 無水物中には2つの異なる分子状態が存在することが示された。それぞれの化学シフト値 (δ_{CS}) 及び核四極子相互作用の大きさ (P_Q) を求めた結果、各ピークで表される Na 核周辺の磁場環境及び Na 核の歪み程度が大きく異なっていることが明らかとなった。単結晶 X 線構造解析の結果から、SN 無水物中には単位格子中に2つの状態の Na が存在することが既に明らかとなっており、 ^{23}Na -MQMAS NMR スペクトルで認められたピークはこれら2つの Na 核を反映していると考えられた。各水和物についても同様に ^{23}Na -MQMAS NMR 測定を行ったところ、SN 一水和物及び SN 四水和物の Na の状態は1つ、SN 二水和物では2つ存在することが観察された。また、 ^{23}Na -MQMAS NMR スペクトルで観察される Na のピークの δ_{CS} 値及び P_Q 値は、各水和物間でそれぞれ明瞭に異なる値を示した。 ^{23}Na -MQMAS NMR 法による 1.0%SN 一水和物製剤中の SN 分子状態を評価した。粉末 X 線回折及び ^{13}C -固体 NMR 測定では、添加剤に由来するピークに隠れて SN ピークを観測することが困難であった。一方、 ^{23}Na -MQMAS NMR 測定では、Na のピークが明瞭に観察され、 δ_{CS} 値、 P_Q 値ともに SN 一水和物のピークと近い値を示した。このように低含量製剤でも薬物の分子状態を正確かつ容易に評価可能であることが明らかとなった。以上の結果より、MQMAS NMR は製剤・製品中の結晶多形の識別や分子状態の評価等に幅広く応用できる有用な手法であることが示された。

1. 研究目的

機能性食品や医薬品の製剤開発研究では、化合物の安定性を損なうことなく、その効果を最大限に発揮させるための様々な検討が行われている。機能性食品や医薬品に用いられる化合物の多くは塩基性あるいは酸性の官能基を持っているものが多いことから、溶解性や安定性改善を目的とした塩選択の検討は広く用いられる手法である⁽¹⁾。しかし、これらの塩を調製した際、水分の吸着や水和物・多形の形成が生じる場合があり、特に高湿度な

環境においては、水分吸着による安定性、流動性、圧縮性、溶解性などへの影響は顕著である。このことから、塩の製剤工程において水の存在は非常に重要視されており、製剤中における水の状態及び水が化合物の塩に与える影響を正確に評価することは、製剤の品質を維持・管理する上で必要不可欠である。

無水物・水和物を研究する上で用いられる主な手法として、粉末 X 線回折測定、熱分析、赤外吸収スペクトル測定、近赤外吸収スペクトル測定、固体 NMR 測定、顕

微鏡測定などが挙げられる。しかしながら現在、有機化合物の構造に含まれる金属原子の分子状態を直接評価する方法は確立されておらず、原子吸光分析法・示色反応等による間接的な定量評価に留まっているのが現状である。固体 NMR 測定は、最近になって固形製剤の物性評価に用いられ始めた手法である⁽²⁾。固体 NMR 測定の特徴は、非破壊的計測であることはもちろん、得られる情報が一つ一つの原子核からの情報の集積であり、個々の原子核の与えるシグナルの化学シフトは極めて局所的な磁気的環境からのみ影響を受けるという点である。そのため、非晶質物質や混合物であっても、化合物の分子状態を原子レベルで選択的に測定することが可能である。また、固体 NMR 測定における緩和時間の測定、線形解析等により固体状態の分子のコンフォメーションや運動性等の様々な情報が得られることから、化合物の定量分析や、構造解析に利用されている。現在、¹H, ¹³C, ¹⁵N 等の核(核スピン I=1/2)の有機化合物の構造解析手法については測定・解析手法が確立してきたと言える。それに対し、核スピン I>1 の半整数スピン核(I=3/2, 5/2, ...)である四極子核は、金属核の大部分を占めるにも関わらず、これらを含む化合物の解析はあまり一般的ではない。これは、①原子核の電荷分布が球対称でないことから生じる相互作用(核四極子相互作用)の影響によって信号がシフトしてしまい正しい化学シフト値が容易に得られないこと、②単純な高速回転のマジック角回転(magic angle spinning; MAS)スペクトルでは対称性の悪い粉末パターンを示し、複数のピークの分離が困難であること、が原因である。しかし近年、多量子 MAS (multiple-quantum magic angle spinning; MQMAS) 法が開発され、これまで測定が困難であった ¹¹B, ²³Na, ²⁷Al, ²⁵Mg 等の四極子核の高分解能化が可能となった⁽³⁾。そして現在では、固体 NMR 装置の発展に伴い、MQMAS 法は無機固体材料分野等で金属核の分子状態を評価できる強力な手法として注目を集め、盛んに利用され始めている。

本研究では、四極子核を含む有機化合物の金属塩の分子状態を検討するため、新しい物性評価法として MQMAS NMR 測定を行い、その有用性を検討した。モデル化合物として、4 種の無水物・水和物が報告されているナプロキセン Na(SN, Fig. 1)について、各試料中の Na 核周辺の磁場環境の違いを ²³Na-MQMAS NMR 測定に

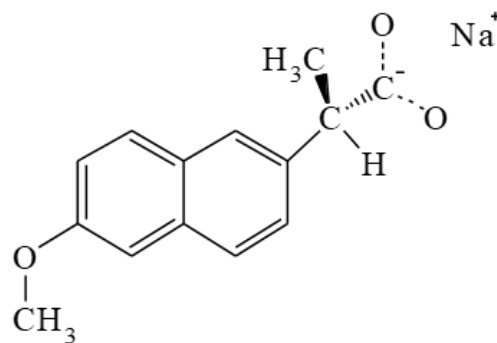


Fig. 1. Chemical structure of sodium naproxen (SN)

より評価した。また製剤学的応用として、SN 含量の低い製剤においても ²³Na-MQMAS NMR 測定を行い、化合物の分子状態を評価した。

2. 研究方法

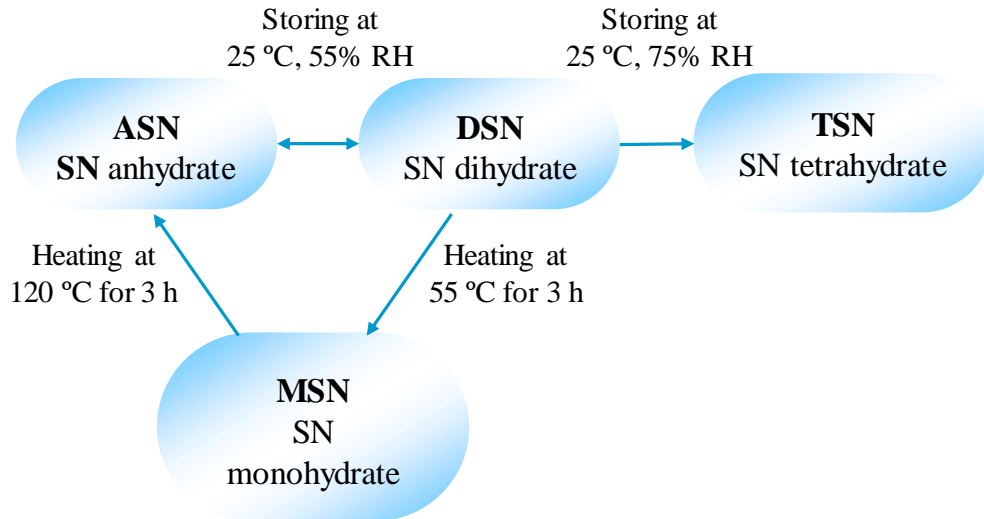
2.1 試薬

ナプロキセン Na ((S)-Naproxen, sodium salt; SN) は Toronto Research Chemicals 社製より購入したものをそのまま用いた。ヒプロメロース (Hypromellose TC-5E; HPMC, 信越化学工業株式会社製) 及びマンニトール (D-Mannitol; Man, 東和化成工業株式会社製) は市販品をそのまま使用した。

2.2 試料調製法

2.2.1 調湿処理物

Scheme 1 に各無水物及び水和物の調製法をまとめた模式図を示す。SN 無水物 (ASN) を、硝酸マグネシウム 6 水和物飽和水溶液を用いて 25°C, 55% RH (relative humidity) で約 2 週間調湿することにより、SN 2 水和物 (DSN) を調製した。ASN を、塩化ナトリウム飽和水溶液を用いて 25°C, 75% RH で約 1 週間調湿することにより、SN 4 水和物 (TSN) を調製した。さらに DSN を、ガスクロマトグラフ用オープン (島津製作所 GC-12A) を用いて、55°C にて 3 時間加熱することにより SN 1 水和物 (MSN) を調製した。MSN の保存は、塩化リチウム無水物飽和水溶液を用いて 25°C, 11% RH にて行った。さらに、各水和物は 120°C にて 3 時間加熱することにより ASN を調製することが可能である。



Scheme 1. Sample preparation method of SN hydrates

2. 2. 2 1.0% MSN 製剤

MSN, HPMC 及び Man を, 重量比 1:4:95 で Vortex mixer を用いて 5 分間混合することにより 1.0% MSN 製剤を調製した。

2. 2. 3 固体 NMR 測定

マグネットとして日本電子製 JNM-ECA600 (14.1 T), プローブとして日本電子製 4.0 mm CP MAS プローブ及び 3.2 mm MQMAS プローブを用いて, MAS 回転数 15-20 kHz で測定を行った。

3. 研究結果・考察

3. 1 SN 無水物及び水和物の分子状態の評価

3. 1. 1 粉末 X 線回折 (PXR) 測定による検討

調製した ASN, MSN, DSN 及び TSN について PXR 測定により評価した (Fig. 2)。ASN では $2\theta = 12.9, 17.4, 18.3^\circ$ に, MSN では $2\theta = 12.5, 15.8, 16.8^\circ$ に, DSN では $2\theta = 11.9, 17.6, 19.4^\circ$ に, TSN では $2\theta = 12.3, 14.1, 16.1, 19.6^\circ$ にそれぞれ特徴的な回折ピークを示し, 各水和物間で異なる回折パターンが観察された。また, 各回折パターンと Di Martino らの論文⁽⁴⁾で報告されている回折パターンを比較したところ, それぞれ対応する水和物が一致したことから, 調湿により異なる構造の水和物の形成が確認された。

3. 1. 2 固体 ^{13}C -CP/MAS NMR 測定による検討

SN 水和物の分子状態を評価するため, 固体 ^{13}C -CP/MAS NMR 測定により詳細な検討を行った。Fig. 3 には ASN, MSN, DSN 及び TSN の ^{13}C -CP/MAS スペク

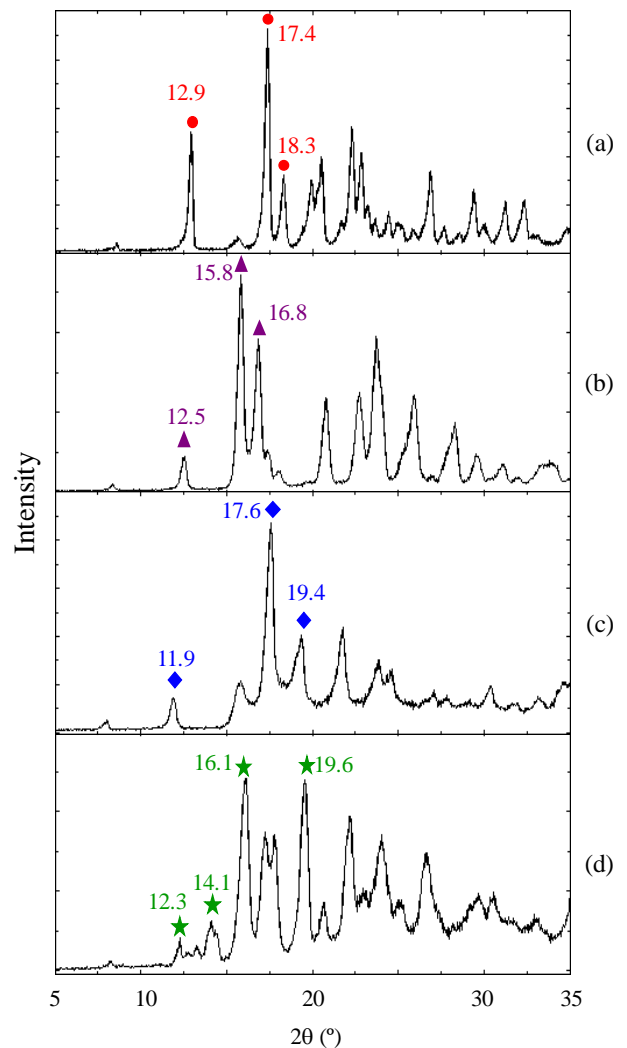


Fig. 2. Powder X-ray diffraction (PXR) patterns of (a) ASN, (b) MSN, (c) DSN, and (d) TSN

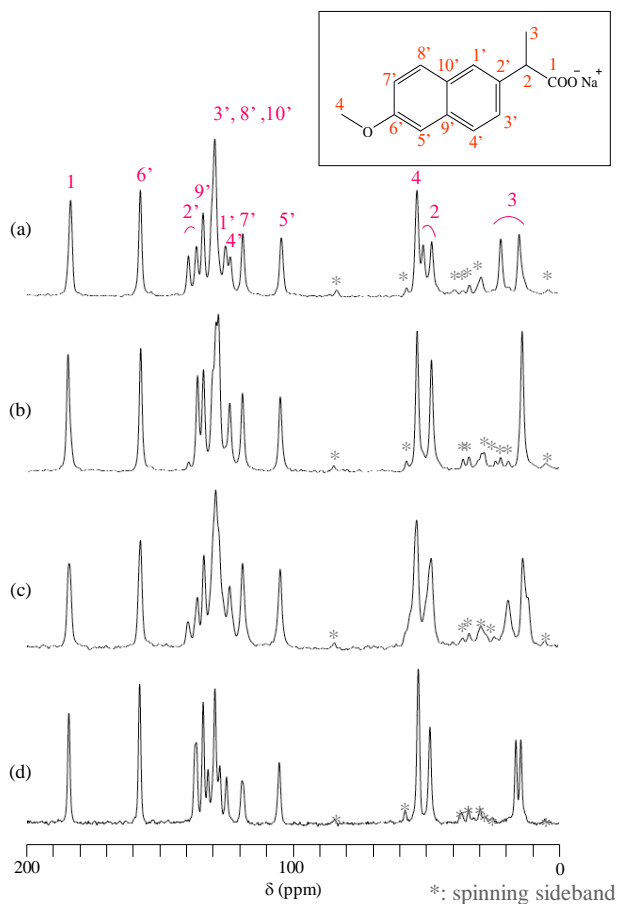


Fig. 3. ^{13}C cross polarization/magic-angle spinning (CP/MAS) NMR spectra of (a) ASN, (b) MSN, (c) DSN, and (d) TSN

トルを示す。*で示したピークは、固体状態において化学シフトの異方性由来して観察されるメインピークのサテライトピーク(spinning sideband)であり、数字で示したピークはSN由来のピークである。各々のスペクトルを比較した結果、C3のメチル基由来のピーク及びC1'~C4', C7'~C10'のナフタレン環由来のピークの化学シフト値に違いが観察され、各試料間の構造の違いが確認された。また、ASN, DSN及びTSNではC3のメチル基由来のピークが2本に分裂しているのに対し、MSNでは単一のピークを示した。このことから、単位結晶格子中にMSNではナプロキセンの分子状態は1つ、ASN, DSN及びTSNでは2つ存在すると推察された。

3. 1. 3 固体 ^{23}Na - MAS NMR 測定による検討

各試料のNa核の分子状態を評価するため、従来の測定法であるシングルパルス法を用いた固体 ^{23}Na -MAS NMR 測定を行った。Fig. 4にはASN, MSN, DSN及び

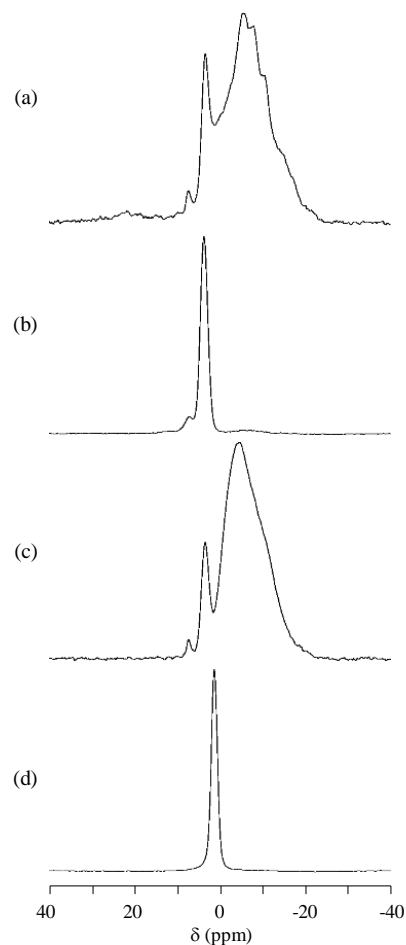


Fig. 4. ^{23}Na -MAS NMR spectra of (a) ASN, (b) MSN, (c) DSN, and (d) TSN

TSNの ^{23}Na -MAS スペクトルを示す。得られたスペクトルの線形は各試料間で異なり、Na核の分子状態の違いが示唆された。ASN及びDSNでは非対称でブロードなピークが観察され、ピークの本数及び化学シフト値が不明瞭であり、Na核の分子状態を正確に評価するのが困難であった。これはNa核の強い核四極子相互作用の影響であると考えられた。一方、MSN及びTSNでは1本のシャープなピークを示し、Na核の核四極子相互作用による影響が弱いと考えられた。

3. 1. 4 固体 ^{23}Na - MQMAS NMR 測定による検討

次にNa核の分子状態を正確に評価するため、固体 ^{23}Na -MQMAS NMR 測定を行った。Fig. 5にはASNの ^{23}Na -MQMAS スペクトルを示した。MQMAS スペクトルでは、横軸は化学シフトと核四極子相互作用を含んだMAS次元軸、縦軸は化学シフトと核四極子相互作用の2次摂動の等方シフトを含むピークの先鋭化した等方(Isotropic)

シフト次元軸となっている。二次元スペクトル上に2つのピークが明瞭に観測されており、Na の状態が2つあることが分かる。さらに、真の化学シフト値を示す CS (Chemical shift) 軸及び核四極子相互作用を示す QIS (Quadrupole induced shift) 軸を用いて詳細な解析を行った。ここで、CS 軸の傾きは1、QIS 軸の傾きは-10/17であり、これらは核スピン数、多量子遷移の量子数及び測定法によらず一定である。

電荷分布の対称性が極めて高い(核四極子相互作用がほぼ0である)ピークの場合、MQMAS スペクトルではCS 軸上に現れることになる(ただし、実際には核四極子相互作用が非常に小さい場合、0 に近づくにつれて感度は低下し、完全に0ではMQMAS スペクトルは得られない)。しかし一般的な試料の場合、核四極子相互作用は0ではないため、MQMAS スペクトルでは核四極子相互作用の増大に従い、QIS 軸に沿ってCS 軸から離れていく。また結晶性の高いピークは横軸に平行に現れ、MAS スペクトルでは複数のピークが混在して分離できない場合でも、MQMAS スペクトルの縦軸ではピークが分離し、解析することが可能となる。さらに、MAS 次元軸方向のピークの重心をX、等方シフト次元軸方向のピークの重心をYとすると、以下の式から真の化学シフト値 δ_{CS} や核四極子相互作用

の大きさを表すパラメータである P_Q 等を求めることができる。このように、MQMAS スペクトルでは明瞭にピークを分離でき、それぞれのピークにおける真の化学シフト値及び核四極子相互作用の大きさを求めることが可能である。ASN において上記の式を用いた結果、Peak 1 では $\delta_{CS} = 4.76$ ppm、 $P_Q = 1.12$ MHz、Peak 2 では $\delta_{CS} = 3.72$ ppm、 $P_Q = 3.03$ MHzとなり、各ピークで表されるNa 核周辺の磁場環境及びNa核の四極子相互作用の大きさが顕著に異なることが明らかとなった。

Fig. 6 (a) には、Kimらによって報告されたASNの結晶構造を示した⁶⁾。ASNでは、1つの結晶格子中にねじれ角の異なるアシンメトリーなナプロキセン分子A及びBが存在し、さらにそれぞれに対応するNa I及びNa IIが存在する。MQMAS NMR スペクトルで観察されたPeak 1及びPeak 2はこれら2つの状態のNa核を反映していると考えられた。そこで、Peak 1及びPeak 2について、ピークの同定を行った。Na I及びNa IIは共に4つの酸素原子に囲まれており、その原子間距離はFig. 6(b)に示す通りである。Na Iでは、4本の原子間距離を比較すると r_1 だけ長く、Na核の電荷分布の対称性が低いことが考えられる。一方Na IIでは、4本の原子間距離が比較的近い値をとり、Na核の電荷分布の歪みは平均化され、対称性が高いことが

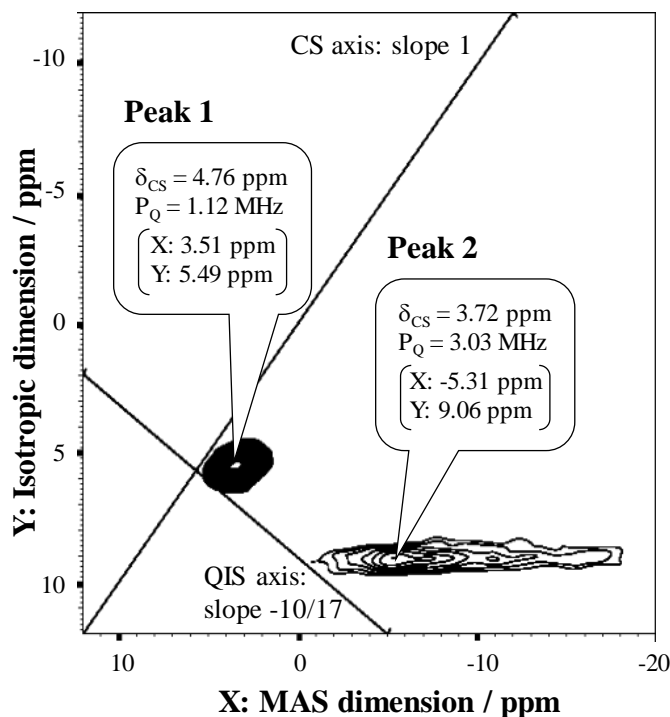


Fig. 5. ^{23}Na -multiquantum (MQ) MAS NMR spectrum of ASN

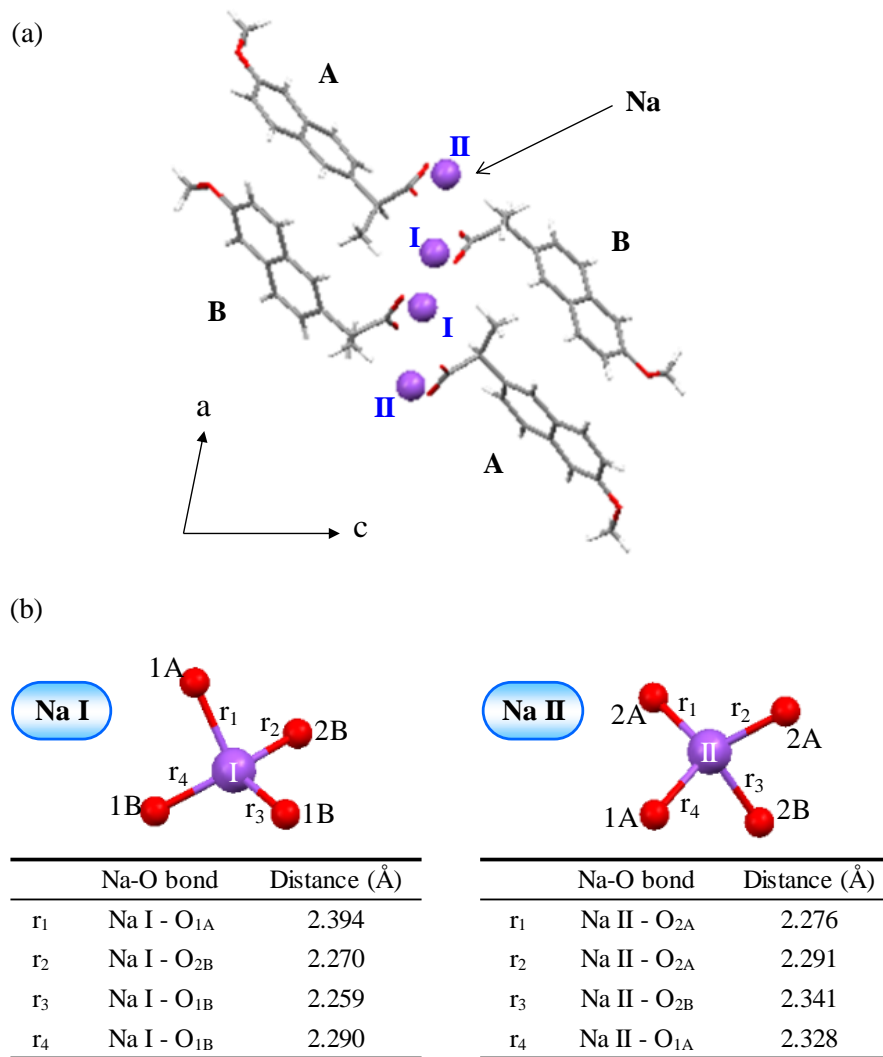


Fig. 6. (a) Crystal structure of ASN along the b-axis and (b) local structure of the sodium sites and distances between Na and O

考えられる。以上のことから、Na Iは核四極子相互作用の大きいPeak 2, Na IIは核四極子相互作用の小さいPeak 1であると同定した。

Fig. 7にはASN, MSN, DSN及びTSNの²³Na-MQMASスペクトルを示した。ASN及びDSNでは2つの状態のNa核, MSN及びTSNでは1つの状態のNa核の存在が観察され, それぞれのピークの δ_{CS} 値及び P_Q 値は, 各試料間で明瞭に異なる値を示した。以上の結果から, ²³Na-MQMAS法により4種類のSN無水物及び水和物が明瞭に区別されることが明らかとなった。

3. 1. 5 ²³Na-MQMAS NMR 測定による製剤中におけるSNの評価

MQMAS法による製剤学的応用について検討するた

め, 1.0% MSN製剤について²³Na-MQMAS NMR測定によるSNの分子状態の評価を行った。PXRD測定や固体¹³C-CP/MAS NMR測定では, 添加剤のピークが重なりSNのピークを観測することが困難であった (data not shown)。一方, 1.0% MSN製剤の²³Na-MQMASスペクトル上には, SN中のNa原子に由来するピークが明瞭に観察され, MSNのピークと比較すると δ_{CS} 値, P_Q 値共にほぼ同じ値を示し, 1.0%製剤中でのSNの分子状態を正確かつ容易に評価可能であった (Fig. 8)。以上のことから, PXRD測定及び固体¹³C-CP/MAS NMR測定では薬物ピークの観測が困難な製剤処方においても, ²³Na-MQMAS NMR測定により薬物ピークの観測及び同定が可能であることが示された。

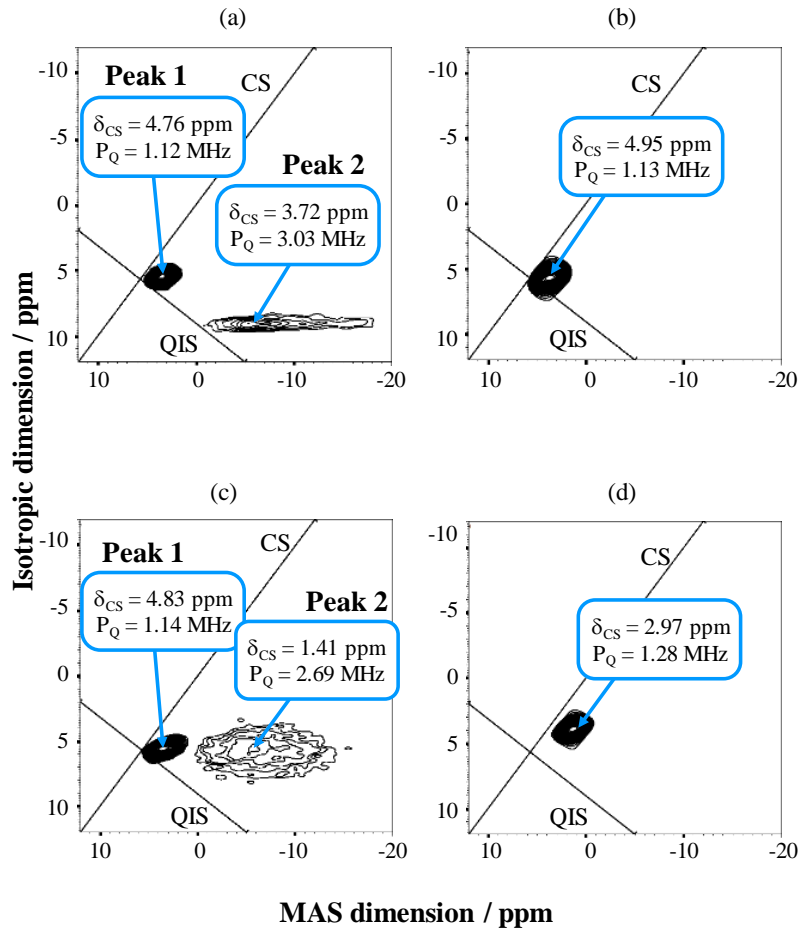


Fig. 7. ^{23}Na -MQMAS NMR spectra of (a) ASN, (b) MSN, (c) DSN, and (d) TSN

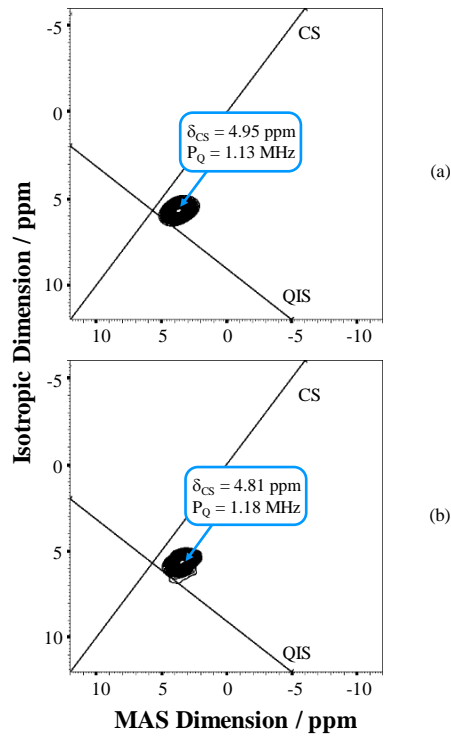


Fig. 8. ^{23}Na -MQMAS NMR spectra of (a) MSN and (b) 1.0% MSN formulation

4. 今後の課題

本研究では、 ^{23}Na -MQMAS NMR を用いることで、核四極子相互作用により従来の ^{23}Na -MAS NMR では正確に評価できなかった4種類のSN無水物及び水和物が明瞭に区別され、それぞれのピークについて真の化学シフト値及び核四極子相互作用の大きさを得ることができた。今後は、NMR の応用測定である緩和時間測定、 ^1H -CRAMPS NMR 測定、シグナル強度の ^1H - ^{23}Na CP 接触時間依存性実験等を併用することにより、各SN水和物中の水分子の状態を詳細に検討する予定である。さらに、今回はモデルとして医薬品であるSNを用いたが、今後は機能性食品を測定対象とし、 ^{23}Na 核に加えて以外の四極子核 (^{11}B , ^{27}Al , ^{25}Mg 等) についても新たに評価することで、食品分野における MQMAS 法の有用性・汎用性を検討する。

5. 文献等

- (1) A. T. M. Serajuddin, Salt formation to improve drug solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59:603-616 (2007).
- (2) 東 顕二郎, NMR. 固体医薬品の物性評価 第2版, 日本薬剤学会物性 FG 監修, pp. 94-124, じほう (2018)
- (3) L. Frydman, J. S. Harwood, Isotropic spectra of half-integer quadrupolar spins from bidimensional magic-angle spinning NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 117:5367-5368 (1995).
- (4) P. Di Martino, C. Barthélémy, E. Joiris, D. Capsoni, A. Masic, V. Massarotti, R. Gobetto, M. Bini, S. Martelli, A new tetrahydrated form of sodium naproxen. *J. Pharm. Sci.* 96: 156-167 (2007).
- (5) Y. Kim, D. VanDerveer, R. W. Rousseau, A. P. Wilkinson, Anhydrous sodium naproxen. *Acta Cryst. E60*: m419-m420 (2004).

Effect of Salts on Solubility, Absorption and Stability of Food Ingredients Evaluated by Noninvasive Analytical Methods

Kunikazu Moribe, Kenjiro Higashi, Keisuke Ueda

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

Summary

Organic salts offer advantages over the corresponding free acid or base in terms of solubility and dissolution. However, the potential disadvantages including hygroscopic and deliquescent properties, result in poor stability of the salt formulations. Recently, multiple-quantum magic-angle-spinning (MQMAS) method has been reported as a new solid-state NMR technique in order to observe the molecular states of half-integer quadrupolar nuclei directly. In the present study, we have conducted ^{23}Na ($I=3/2$)-MQMAS NMR experiment on four different hydrates of sodium naproxen (SN): anhydrous (ASN), monohydrated (MSN), dihydrated (DSN), and tetrahydrated (TSN) forms. Conventional ^{23}Na -MAS NMR spectrum of ASN showed broad peaks because of the nuclear quadrupole coupling of ^{23}Na . On the other hand, two well-separated peaks were observed on the two-dimensional ^{23}Na -MQMAS NMR spectrum of ASN. The isotropic chemical shift (δ_{CS}) and the quadrupolar parameter (P_{Q}) of the peaks derived from projection onto the chemical shift (CS) and quadrupolar induced shift (QIS) axes respectively, were different each other. From the results of X-ray crystallographic analysis, there are two different types of sodium nuclei in a crystal lattice of ASN. They were well reflected on the two peaks in MQMAS NMR spectrum. ^{23}Na -MQMAS NMR measurements were carried out on the other hydrates. Two peaks were observed in DSN spectrum, while MSN and TSN showed one peak in each spectrum. The values of δ_{CS} and P_{Q} were different among the four hydrates. Furthermore, the molecular states of sodium nuclei in the 1.0% MSN formulation, which were not observed by powder X-ray diffraction and ^{13}C solid state NMR measurements, were accurately evaluated by ^{23}Na -MQMAS NMR technique. In conclusion, four different hydrates of sodium naproxen were clearly distinguished by ^{23}Na -MQMAS NMR measurement. MQMAS NMR spectroscopy would be a useful method for evaluating molecular states of organic salts containing quadrupolar nuclei in the formulation as well as the product, especially at the low dose.