

固体 NMR および蛍光測定による
ゲスト封入メソポーラスシリカ前駆体の物性評価

2015 年

千葉 亮

目次

総論の部	
第1節 緒言	1
第2節 ピレンを封入したメソポーラスシリカ前駆体及び焼成体の調製及び物性評価	
2-1 試料の調製	3
2-2 小角 X 線散乱測定	5
2-3 走査型電子顕微鏡 (SEM)による細孔の観察	7
2-4 固体 ^{29}Si NMR による細孔壁組成の確認	9
2-5 窒素ガス吸着測定	12
2-6 ピレン内封率の評価	14
2-7 熱分析測定による P123 含有率の推定	15
第3節 細孔内の P123 の分子運動性評価	
3-1 前駆体中の P123 の ^{13}C NMR 測定	17
3-2 ^{13}C - T_1 緩和時間測定	21
第4節 内封されたピレンの分子状態評価	
4-1 固体蛍光スペクトル測定	23
第5節 難水溶性薬物の封入及び物性評価	
5-1 ナブメトン封入 MPS 前駆体の調製及び構造評価	25
5-2 ナブメトンの溶出挙動	27
第6節 結論	29
実験の部	30
参考文献	40
謝辞	45

論文目録	46
主査、副査名	47

略語一覧

AS :	前駆体
AS-NBT :	ナブメトン封入前駆体
AS-Py :	ピレン封入前駆体
BET :	Brunauer-Emmett-Teller
BJH :	Barrett-Joyner-Halenda
CA :	焼成体
CA-NBT :	ナブメトン封入焼成体
CA-Py:	ピレン封入焼成体
$^{13}\text{C-T}_1$:	^{13}C スピン - 格子緩和時間
DD/MAS :	dipolar decoupling/magic angle spinning
MPS :	メソポーラスシリカ
NBT :	ナブメトン
P123 :	プルロニック [®] P123
PEO :	ポリエチレンオキサイド
PPO :	ポリプロピレンオキサイド
SAXS :	小角 X 線散乱
SEM :	走査型電子顕微鏡
SLS :	ラウリル硫酸ナトリウム
STP :	標準温度と圧力

総論の部

第1節 緒言

メソポーラスシリカ（以下、MPS）はメソサイズ（2～50 nm）の細孔を有するシリカ多孔性物質であり、界面活性剤が臨界ミセル濃度（cmc）以上で棒状ミセルを形成する特徴を利用して合成される。MPSの比表面積は非常に大きく、一定した細孔構造を有する^{1, 2)}。このような特徴から、MPSは有機合成の反応触媒³⁾や、分離、精製するための素材⁴⁾として様々な分野に研究、応用されている。薬学分野においては、難水溶性薬物を細孔内に封入させることで溶解性を改善する方法が多数報告されている⁵⁻⁷⁾。これは、担体の比表面積が大きいこと及び、細孔内に封入された薬物がエネルギー的に不安定なアモルファス状態を維持することに起因する。一方で細孔内部の表面を改質する方法⁸⁾やMPSに薬物を封入した後にエマルジョンに取り込ませる方法⁹⁾により薬物の放出を抑制する応用例も報告されている。MPSに薬物を封入する場合、焼成体に薬物を封入する手法が多く取られているが^{6, 9)}、焼成前の前駆体に薬物等を封入する方法もある^{10, 11)}。Fuらは前駆体を合成した後にピロキシカムを封入させたものは、焼成体に封入したものよりも溶出性が上昇したことを報告している¹²⁾。前駆体を利用することは焼成工程もしくは抽出工程を省略できる点でメリットがある。しかしながら、前駆体中の薬物等の封入状態を評価した研究は限られており、陽イオン性界面活性剤を用いたMCM-41の系では幾つか報告があるものの^{10, 13)}、ノニオン系界面活性剤であるトリブロックコポリマーを用いたSBA-15の系ではほとんどない¹⁴⁾。

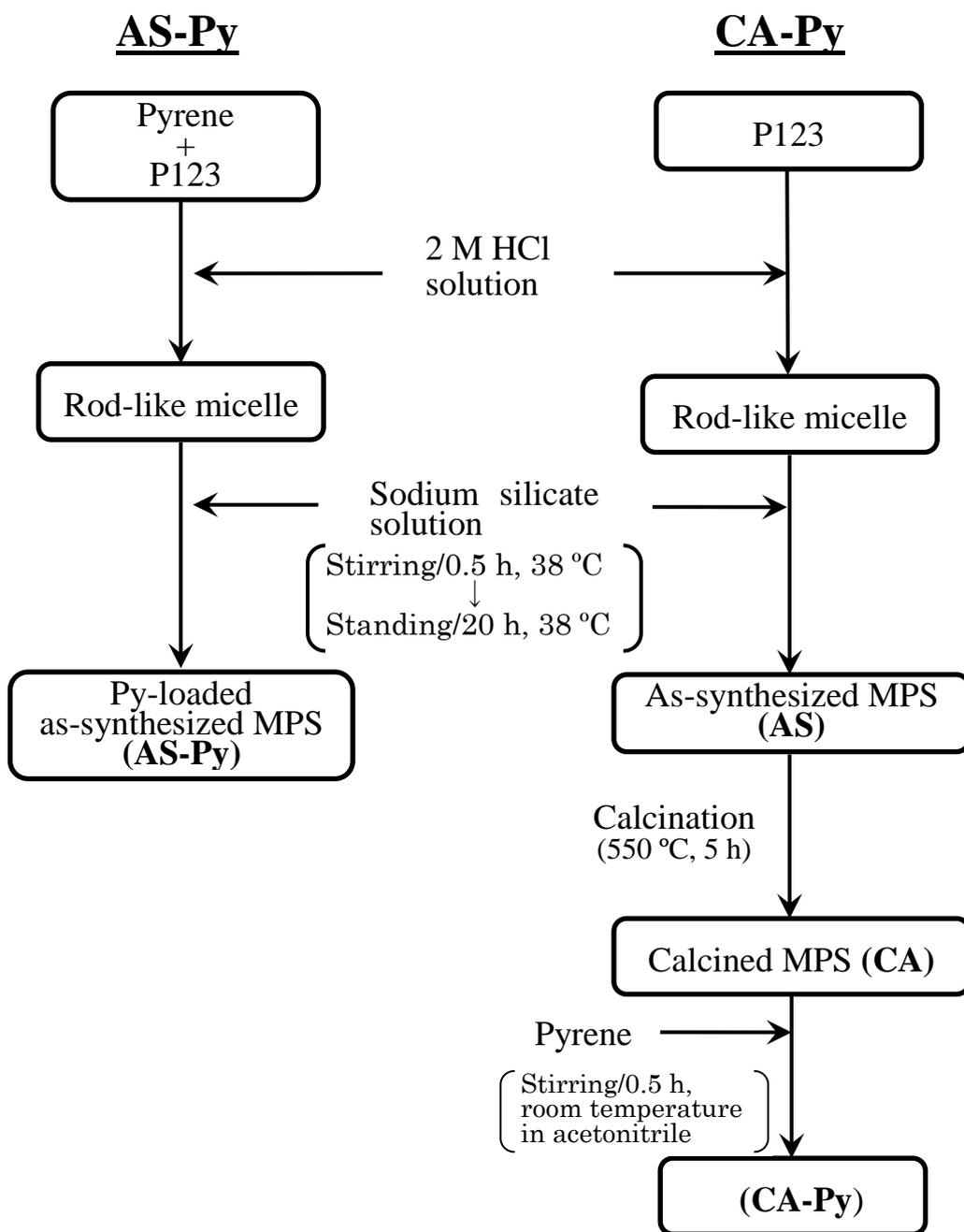
そこで、本研究ではゲスト分子としてピレン（Py）を封入したMPS前駆体を合成し、物性および内封状態の評価を行った。Pyは難水溶性薬物のモデル化合物で、蛍光測定においては微量で測定が可能である。Pyの封入は前駆体を合成した後に封入する方法ではなく、合成時にノニオン系トリブロックコポ

リマーである Pluronic[®] P123(P123)ミセルに取り込ませた状態で行った。得られた Py 封入 MPS 前駆体の細孔構造の確認は小角 X 線散乱測定及び走査型電子顕微鏡観察で行った。また、細孔内の P123 の存在を窒素ガス吸着測定で確認し、P123 の分子運動性を固体 NMR 及び緩和時間測定により評価した。Py の内封状態の評価には固体蛍光測定を利用した。また、内封状態の比較のため焼成体に Py を封入したのもも調製し考察した。最後に、Py をゲスト分子とした結果に基づき、難水溶性薬物であるナブメトン(NBT)をゲスト分子として MPS 前駆体に封入し、構造及び溶出挙動を評価した。

第2節 ピレンを封入したメソポーラスシリカ前駆体及び焼成体の調製及び物性評価

2-1 試料の調製

ピレンを封入したメソポーラスシリカ前駆体 (AS-Py)及び焼成体(CA-Py)の調製は Scheme 1 に示す方法により行った。一般的な MPS の合成では棒状ミセルを形成した界面活性剤溶液にテトラエトキシシランもしくはケイ酸ナトリウム溶液を添加し、約 24 時間反応させた後に水熱反応の工程を入れる。本研究では水熱反応がなくてもメソポーラス構造を形成することが既に報告されていること^{15, 16)}や、水熱反応では酸性水溶液中、高温・高圧の環境になることから封入物が分解してしまう可能性があること、また鑄型分子である P123 が抜け出てしまうためこの工程は省略した。水熱反応を入れることで P123 が抜け出てしまう現象は予備実験により確認された（水熱反応を入れない試料の窒素ガス吸着測定における比表面積 $S_{\text{BET}} = 11 \text{ m}^2/\text{g}$ に対し、水熱反応入れた試料では $S_{\text{BET}} = 101 \text{ m}^2/\text{g}$ であった）。



Scheme 1 Preparation of AS-Py, AS, CA-Py, and CA.

2-2 小角 X 線散乱 (SAXS)測定

小角 X 線散乱測定は散乱パターンから長周期構造を推定することができ、散乱角からは特定の長周期構造の長さを算出することができる。ヘキサゴナル構造の散乱パターンは小角側から(100), (110), (200), (210)の面が観測され、(100)の面間隔 d 値を 1 とした時、それぞれの相対比は 1 : 0.58 : 0.50 : 0.38 となることが知られている。Fig. 1 に AS-Py 及び CA-Py の散乱パターンを示す。AS-Py については(110)ピークは観察されなかったが、(100), (200)及び(210)の相対比が 1 : 0.50 : 0.38 であったことからヘキサゴナル構造であることを推定し、CA-Py も(100), (110)及び(200)の相対比が 1 : 0.58 : 0.50 であったため同構造を有しているものと推定した。AS-Py および及び CA-Py の細孔間隔は $2\theta = 0.82^\circ$ と 0.98° の第一ピークの値から、12.5 nm 及び 10.4 nm と算出した。

<細孔間隔 (L)の算出>

ヘキサゴナル構造における細孔間隔 (Fig. 2)は $d(100)$ 散乱ピークの 2θ の値を Bragg の式に当てはめ、 $d(100)$ の長さを求め、この値を $2/\sqrt{3}$ 倍することで細孔間隔 L の値を算出した。

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad \dots (\text{Bragg の式})$$

ここで、 n : 正の整数、 λ : 波長(0.154 nm)、 d : 格子の面間隔、 θ : 入射角

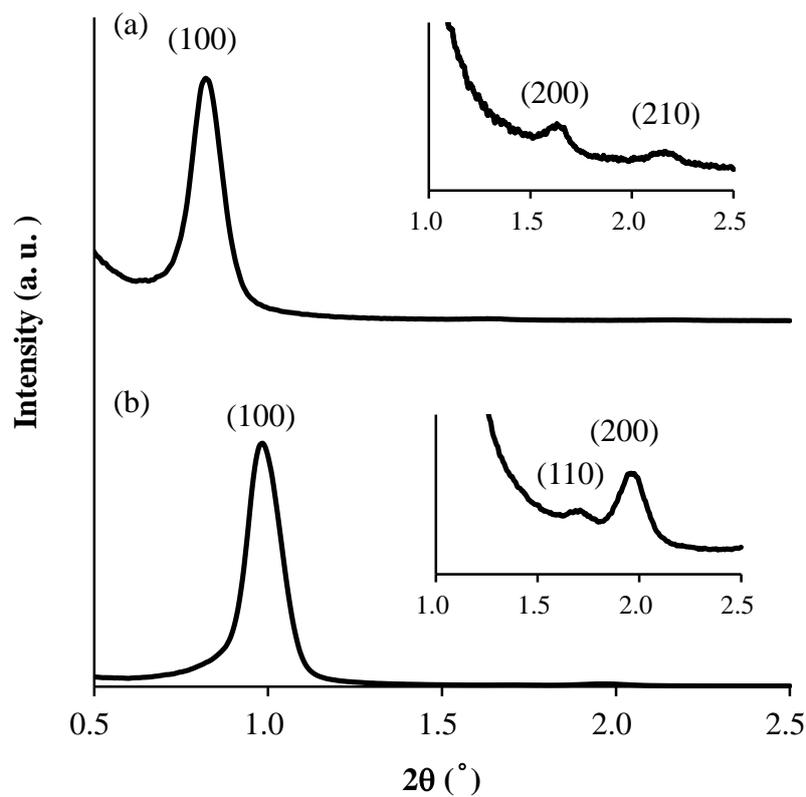


Fig. 1 Small-angle X-ray scattering patterns of (a) AS-Py and (b) CA-Py. Inset figures show magnified peaks.

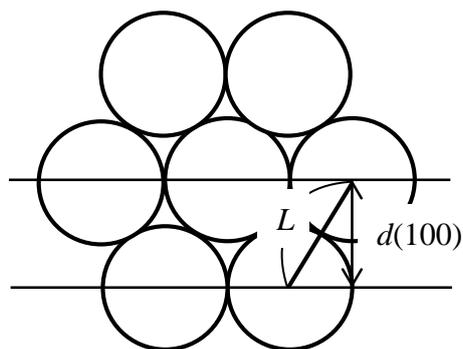


Fig. 2 Unit cell length of hexagonal arrangement.

2-3 走査型電子顕微鏡 (SEM)による細孔の観察

細孔の様子を SEM により観察した。ここで示す細孔径及び細孔壁の厚さについて Fig. 3 に模式図を示した。Fig. 4 より AS-Py 及び CA-Py はヘキサゴナル構造であることが確認できた。また、細孔径及び細孔壁の厚さを計測したところ AS-Py では 7.5 nm 及び 5.2 nm、CA-Py では 5.6 nm 及び 4.6 nm であった。この計測結果から、焼成工程を経ている CA-Py は細孔径が AS-Py に比べて小さくなっていることが明らかとなった。

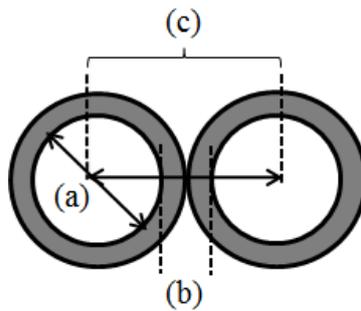
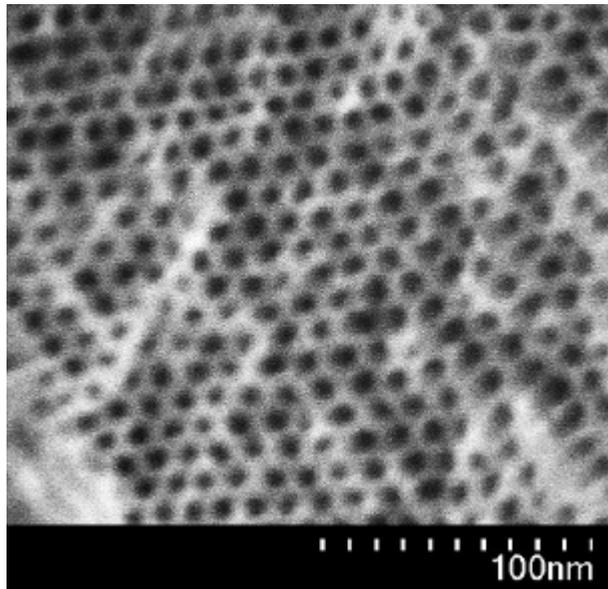


Fig. 3 Schematic representation of (a) Pore size, (b) Wall thickness, and (c) Unit cell length.

(a)



(b)

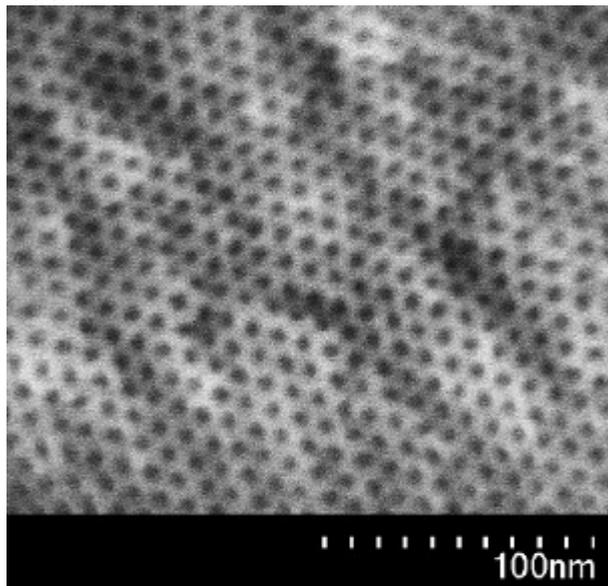


Fig. 4 SEM images of (a) AS-Py and (b) CA-Py.

2-4 固体 ^{29}Si NMR 測定による細孔壁組成の評価

SEM 観察にて焼成工程の有無による細孔径に違いが観察された点について ^{29}Si dipolar decoupling/magic angle spinning (DD/MAS) NMR を利用して細孔壁の組成を評価した。Fig. 5 に Py を含まない AS 及び CA の測定結果を示した。化学シフト値 -110, -101 及び -91 ppm に 3 つのピークが観測され、それぞれ Q^4 ($\text{Si}(\text{OSi})_4$), Q^3 ($\text{Si}(\text{OSi})_3(\text{OH})$) 及び Q^2 ($\text{Si}(\text{OSi})_2(\text{OH})_2$) の ^{29}Si と帰属した。次に、ガウス関数とローレンツ関数の比率が 1:1 の混合関数を用いて波形分離を行い (Fig. 6)、分離した $\text{Q}^2\sim\text{Q}^4$ の相対的なピーク面積比を Table 1 に示した。Table 1 より、CA のシラノール基を有する Q^2 及び Q^3 のピーク面積は AS の Q^2 , Q^3 に比べて下がっている一方で、シラノール基を含まない Q^4 のピーク面積は上昇した。これは、焼成によりシラノール基同士の脱水反応が進行し、細孔が収縮したためと考察し、これらの結果は、SEM 観察から明らかとなった CA-Py の方が AS-Py よりも細孔径が小さいという結果を支持するものであった。

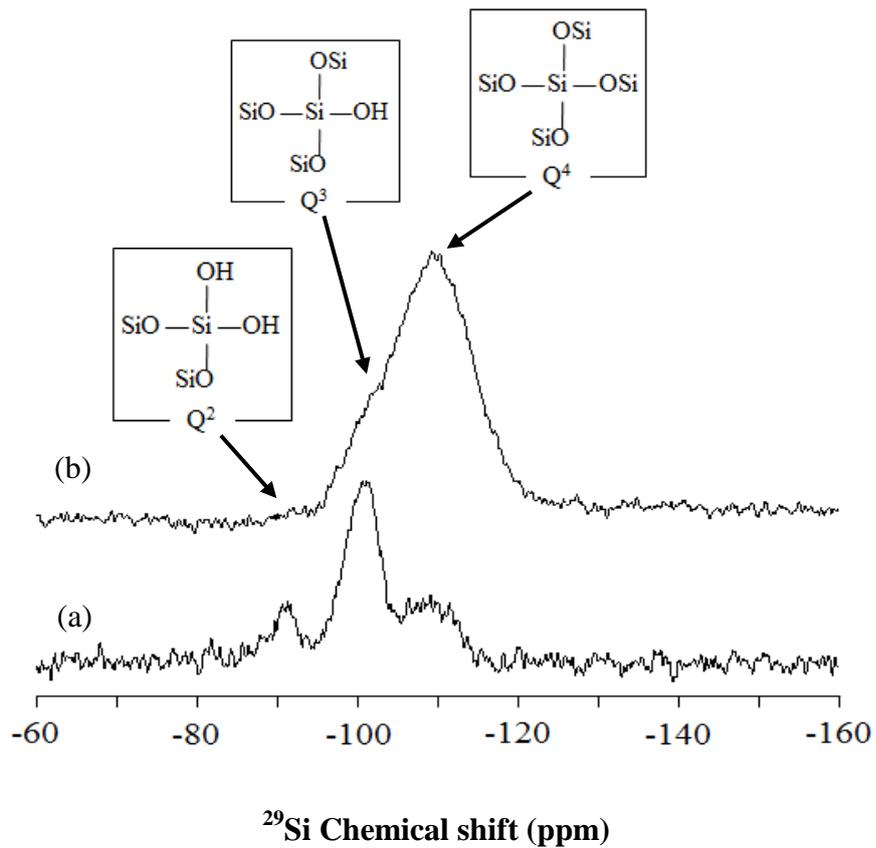


Fig. 5 Solid-state ^{29}Si DD/MAS NMR spectra of (a) AS and (b) CA.

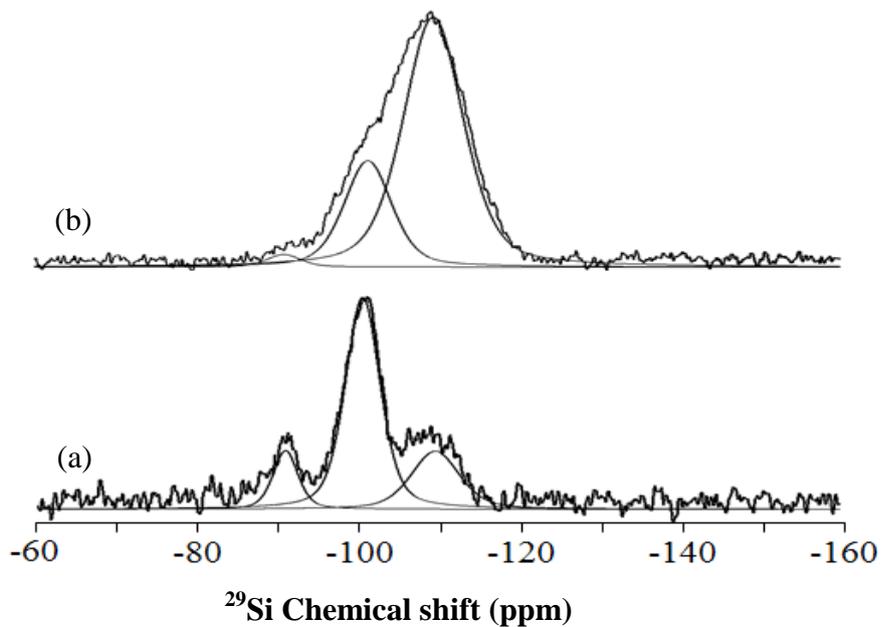


Fig. 6 Deconvolution of the solid-state ^{29}Si DD/MAS NMR spectra of (a) AS and (b) CA.

Table 1 Percentage of peak areas in solid-state ^{29}Si DD/MAS NMR spectra of AS and CA.

	Q^2	Q^3	Q^4
	(%)		
AS	13	63	24
CA	2	25	73

2-5 窒素ガス吸着測定

細孔内空間の状態について評価するために AS-Py 及び CA-Py の窒素ガス吸脱着測定を行った (Fig. 7)。比表面積値及び細孔容積値について Brunauer-Emmett-Teller (BET) 法及び Barrett-Joyner-Halenda (BJH)法に当てはめて解析した。

AS-Py は吸脱着等温線の窒素ガス吸着量が殆どないという結果を示し (Fig. 7a)、比表面積及び細孔容積は $11.1 \text{ m}^2/\text{g}$ 及び $0.03 \text{ cm}^3/\text{g}$ と算出された。これは、AS-Py はメソポーラス構造を有しているものの、焼成していないため界面活性剤である P123 及び Py が保持され細孔内部に空間が殆どないためと推察された。一方、CA-Py は吸脱着等温線においてメソ孔を有する際に特徴的なヒステリシスループが観測された。比表面積及び細孔容積はそれぞれ $334.3 \text{ m}^2/\text{g}$ 及び $0.35 \text{ cm}^3/\text{g}$ であり、AS-Py と比較して極めて大きい比表面積を有していた。これは担体が焼成体であること及び、封入した Py が細孔空間を埋める程の量ではなかったことが原因と考察した。一般的な SBA-15 の焼成物は $500 \text{ m}^2/\text{g}$ 以上の比表面積を有することが多いが、本調製法には水熱反応工程を経ないため、細孔構造に未発達の部分が存在し、やや小さい比表面積になっていると推察された^{16, 17)}。

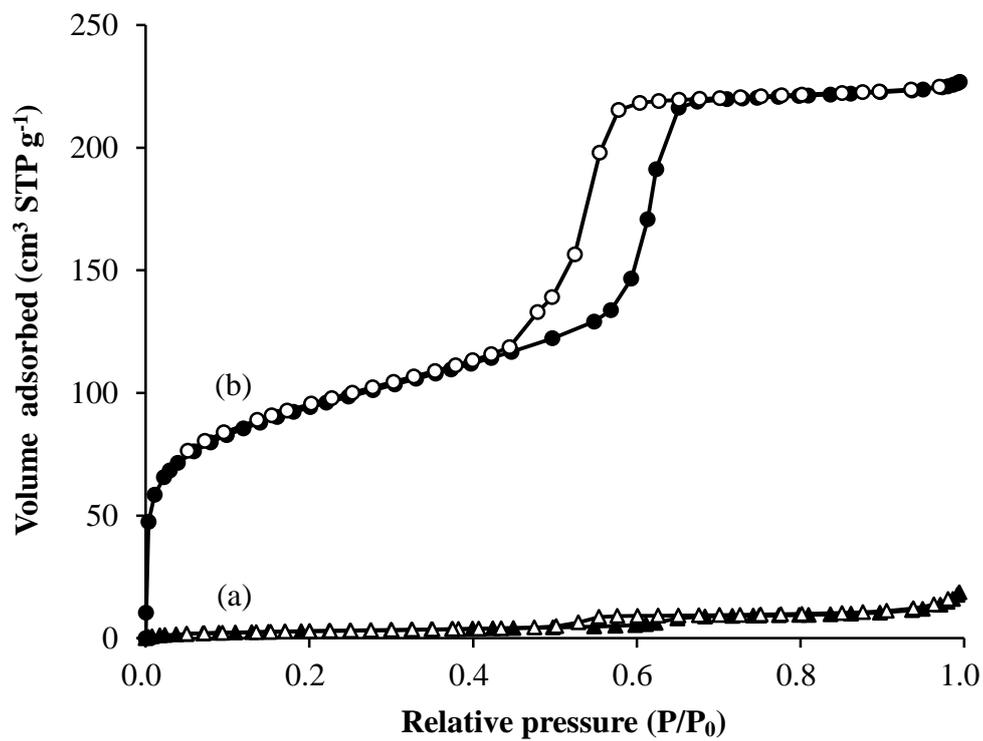


Fig. 7 Nitrogen gas adsorption (● and ▲) /desorption (○ and △) isotherms of (a) AS-Py and (b) CA-Py.

2-6 ピレンの内封率の評価

AS-Py 中の Py はエタノール中で還流することにより抽出し、CA-Py は *n*-ヘキサン中で攪拌することにより抽出した。それぞれ抽出した液を HPLC により定量し、Py の内封率はそれぞれ 1.53% 及び 1.46% と算出された。

2-7 熱分析測定による P123 含有率の推定

AS-Py 及び CA-Py について、30～800 °C の温度範囲で熱質量測定 (TG) を行った (Fig. 8)。AS-Py の組成は細孔構造を形成しているシリカ、細孔内に残存している P123 および封入されている Py と推定される。130～600 °C の範囲での減量率は-47.6%であった。Py の分解は 230 °C 付近、P123 の分解は 370 °C 付近であることから減量分の殆どはこの両成分に由来すること (一部シリカ壁の脱水による減量分が含まれる)、Py の含有量が約 1.5%であることから、試料中の P123 含量はおよそ 45%であると推定した。一方、CA-Py の減量分は 1.8%であることから、試料中に P123 は残存しておらず Py の分解のみとなっていると考察した。

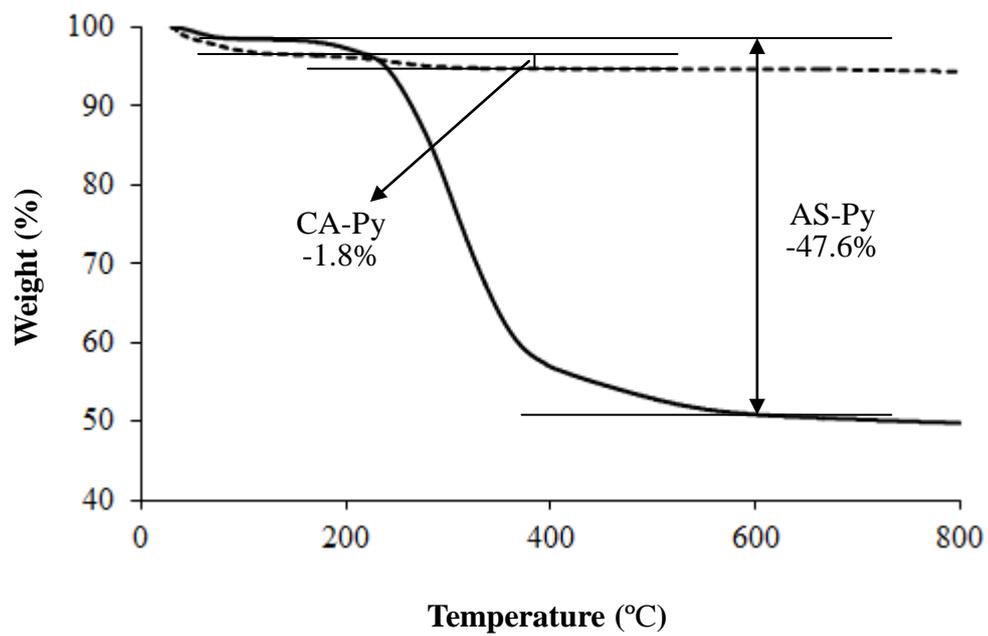


Fig. 8 TG curves of (—) AS-Py and (---) CA-Py.

第3節 細孔内の P123 の分子運動性評価

3-1 前駆体中の P123 の ^{13}C NMR 測定

メソポーラスシリカ前駆体中の P123 の物理化学的状態について考察するため、Py を含有していない AS の ^{13}C DD/MAS NMR 測定を実施した。また、P123 の状態を比較するため、ペースト状の P123 単体について ^{13}C DD/MAS NMR 測定を、さらに 50 mg/mL の濃度で D_2O に溶解させた P123 について ^{13}C NMR を測定し、結果をそれぞれ Fig. 9-11 に示した。

P123 は親水部のポリエチレンオキシド (PEO) 及び疎水部のポリプロピレンオキシド (PPO) から構成されており、PPO 部には 3 種の異なる carbon が含まれる。検出されたピークは高磁場側から、PPO(CH_3), PEO(CH_2), PPO(CH_2), PPO(CH) と帰属した。Fig. 9 より、AS 中の P123 の各 carbon のピークは線幅に広がりがあった。特に 70 ppm 付近に認められる PEO 部の CH_2 のピークは他の PPO 部を構成する ^{13}C のピークと比べてブロード化が顕著であった。固体 NMR スペクトルにおけるピークのブロード化の原因として、①等方性化学シフトの分布の広がり、②運動性の低下が挙げられる。ここで認められた P123 の PEO 鎖のピークが特にブロードであった理由として、PEO 鎖の先端が部分的にシリカ壁に入り込んでいるため、シリカ表面と PEO 鎖の相互作用度合の違いによる化学シフトの分布 (Distribution of isotropic chemical shift) が生じたこと、PEO 鎖がシリカネットワークに組み込まれることで運動性が低下したことなどが挙げられる。測定温度を変化させた場合、温度上昇とともにピークが先鋭化したことから、ピークのブロード化に運動性が関係していることが示された。

一方、P123 単体では全体的にピークがシャープであり、AS と比較して、P123 の運動性が高いことが明らかとなった (Fig. 10)。特に、PEO 鎖と PPO

鎖で比較した場合、PEO 鎖の carbon の方がよりシャープなピークを示し、AS の場合とは逆の結果となった。これらの結果は、AS では PEO 鎖がシリカ表面と相互作用しているという考察を支持するものである。D₂O 溶液中の P123 (cmc¹⁸⁾ より十分高い濃度)では、AS 及び P123 単体と比較してピーク幅が最もシャープであった(Fig. 11)。これは、D₂O 溶液中において P123 がフリー体とミセルの平衡関係にあり、何れも運動性が極めて高いためと考察した。P123 単体の結果と同様に PEO 鎖と PPO 鎖のピーク幅を比較した場合、PEO 鎖のピークの方がシャープであった。また、AS の場合とは異なり、D₂O 溶液中の P123 は温度上昇とともに僅かにピークがブロード化していた。これは Nivaggioli らの報告¹⁹⁾にあるように、温度上昇に伴い PPO 部がよりコアに集まるために運動性が僅かに低下したためと考察した。

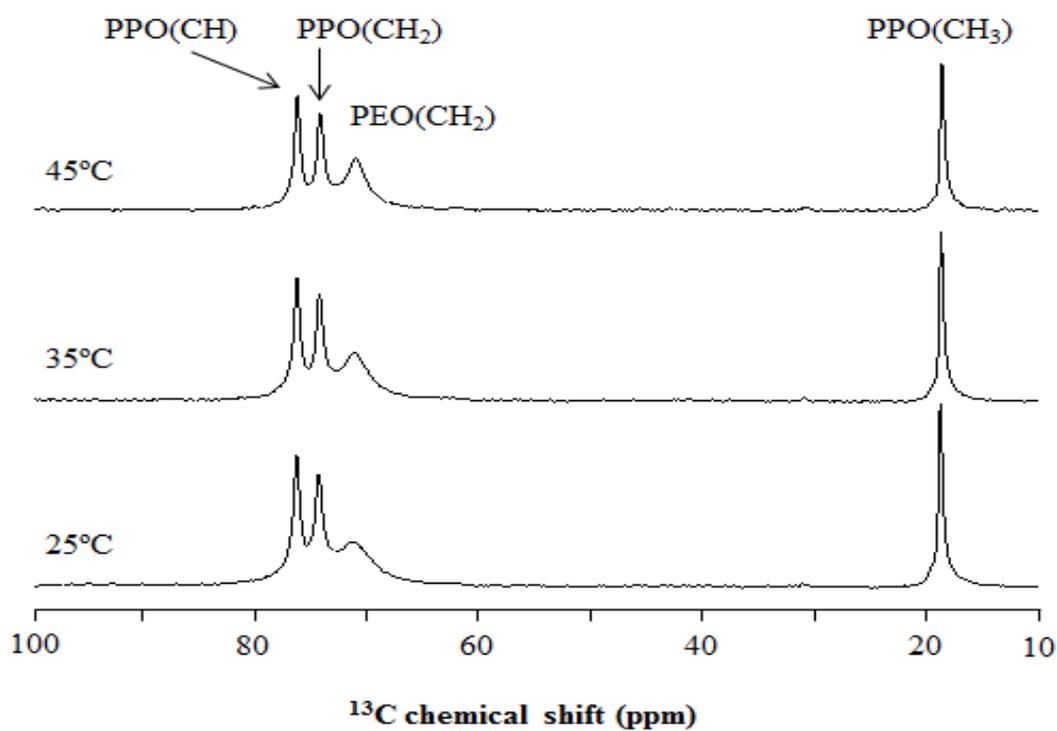


Fig. 9 Solid-state ^{13}C DD/MAS NMR spectra of AS at 25, 35, and 45 °C.

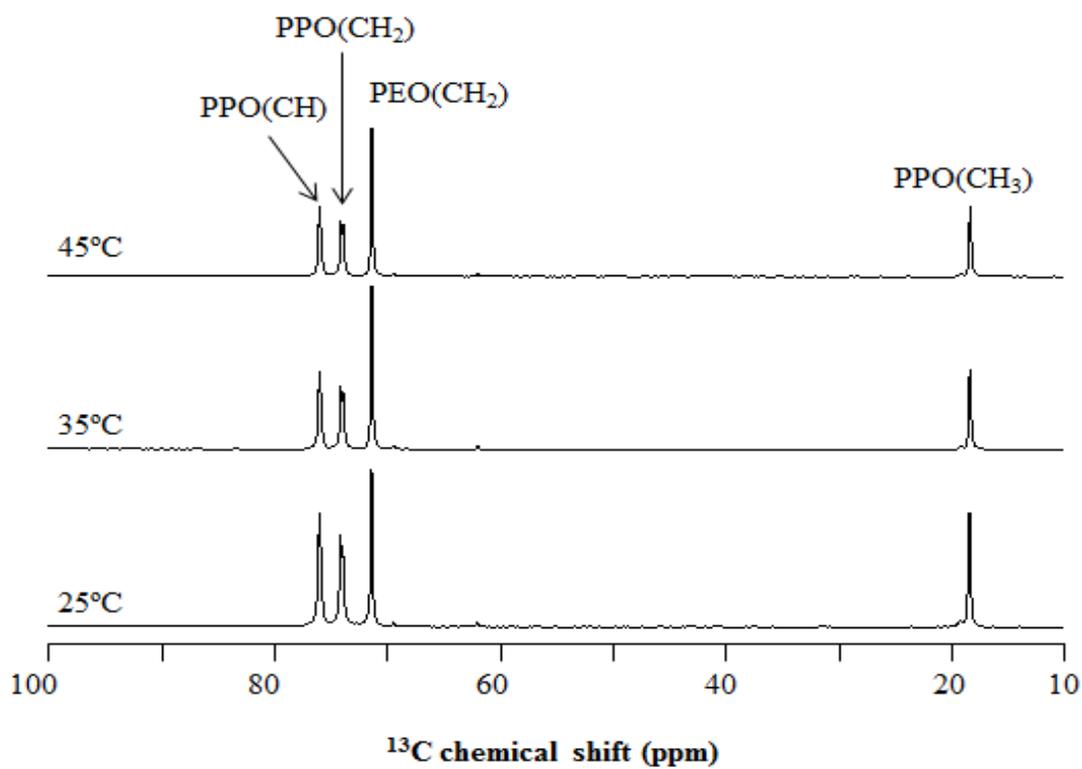


Fig. 10 Solid-state ^{13}C DD/MAS NMR spectra of P123 at 25, 35, and 45 °C.

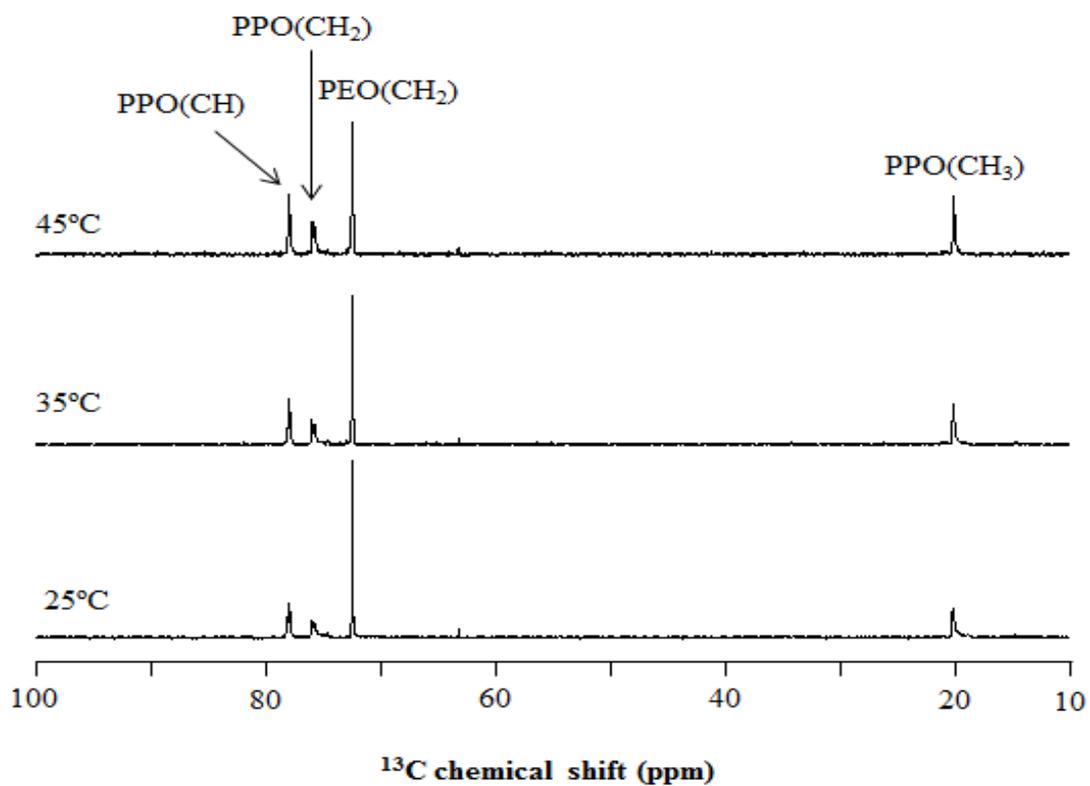


Fig. 11 Solution-state ^{13}C NMR spectra of P123 in D_2O solution at 25, 35, and 45 °C.

3-2 ^{13}C - T_1 緩和時間測定

細孔内に存在する P123 の局所的な分子運動性を詳細に評価するため、 ^{13}C のスピン - 格子緩和時間 (^{13}C - T_1)測定を行った。前項の 1D NMR スペクトルと同様、P123 単体と D_2O 溶液中の P123 も測定した (Table 2)。Fig.12 に示した通り²⁰⁾、 T_1 には極小点が存在し、極小点を境に温度上昇とともに T_1 が上がる extreme narrow range と T_1 が下がる slow motional regime が存在する。前者は運動性が高いことを示し、後者では運動性が低いことを示す^{21,22)}。

AS の $\text{PPO}(\text{CH}_3)$ は 25-45 °C の温度範囲において温度上昇と共に ^{13}C - T_1 の値が増加しているため、extreme narrow range にあるものと推察された。一方、シリカ壁と相互作用している $\text{PEO}(\text{CH}_2)$ の carbon は温度上昇と共に T_1 の値が低下しており、slow motional regime の範囲にあり運動性が低いことが示された。 $\text{PPO}(\text{CH})$ 及び $\text{PPO}(\text{CH}_2)$ の carbon は温度上昇とともに僅かに T_1 の値が低下している、もしくはほとんど変化がなく T_1 minimum 周辺の運動性領域にあると考察した。一方、P123 単体及び D_2O 溶液中の P123 の全ての carbon は温度上昇と共に ^{13}C - T_1 の値が上昇しており、extreme narrow range に属していることが示され分子の運動性は高いと考察した。以上の結果より、AS の細孔内部の P123 の運動性は、PEO 鎖がシリカ壁と相互作用することにより P123 単体及び水溶液中の P123 と比較して、全体的に運動性が抑制されていることが明らかとなった。以上の結果は、Fig. 9-11 の 1D NMR スペクトルのピークの線幅の結果を支持した。

Table 2 ^{13}C - T_1 of AS, P123 and P123 D_2O solution at 25, 35, and 45 °C.

Samples		PPO(CH)	PPO(CH ₂)	PEO(CH ₂)	PPO(CH ₃)
		sec.			
AS	25 °C	0.64	0.40	0.96	0.76
	35 °C	0.62	0.39	0.72	0.80
	45 °C	0.59	0.41	0.51	0.87
P123 intact	25 °C	0.46	0.30	0.54	0.61
	35 °C	0.49	0.33	0.59	0.78
	45 °C	0.55	0.38	0.71	0.90
P123 D_2O solution	25 °C	0.40	0.26	0.69	0.59
	35 °C	0.48	0.31	0.83	0.65
	45 °C	0.54	0.38	1.13	0.78

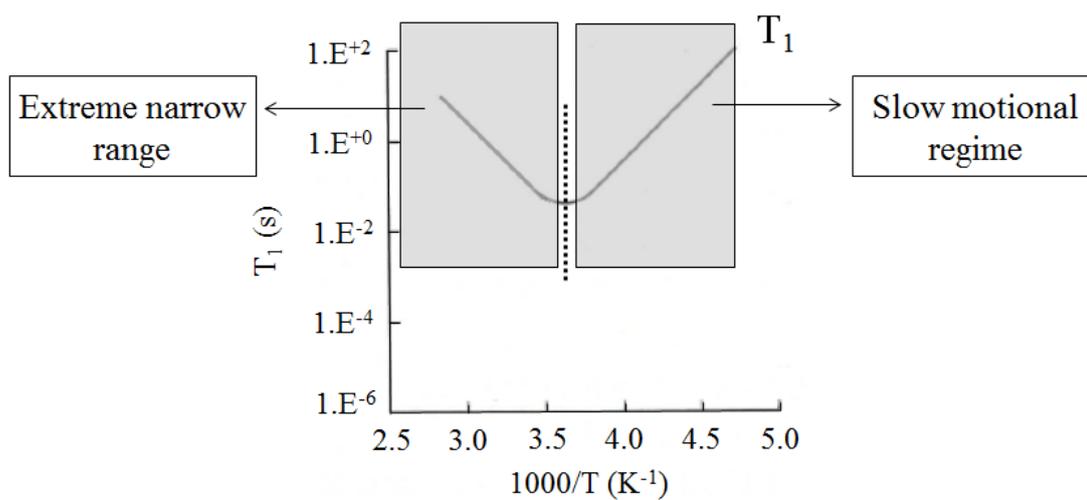


Fig. 12 Temperature dependency of T_1 diagram.

第4節 内封されたピレンの分子状態評価

4-1 固体蛍光スペクトル測定

内封された Py の分子状態を評価するため、固体蛍光スペクトル測定を実施した。本測定は感度の点で優れており、封入する Py は分子の周りの環境により蛍光発光スペクトルに違いが出ることから、MPS 内部の状態を評価可能である²³⁻²⁵⁾。Py 単体、AS-Py 及び CA-Py の固体蛍光スペクトルを Fig. 13 に示した。(a)は単体の Py、(b)及び(c)は試料中の Py 濃度が 1.5%、(d)及び(e)は試料中の Py 濃度が 0.45% のスペクトルを示している。励起波長 355 nm では、Py のモノマー発光は 392 nm、エキシマー発光は 471 nm に現れている。単体の Py ではモノマー発光が観測されないが、AS-Py 及び CA-Py では両濃度ともにモノマー発光が観察され、Py 濃度が下がる程モノマー発光の比率は増加した。焼成物に Py を封入した CA-Py の結果は、低封入量ではシリカ壁に単分子で吸着することでモノマー発光のピークが観測されるが、封入量が増加すると π - π 相互作用による二量体もしくはそれ以上のスタッキングをするためエキシマー発光のピークが優位に大きくなったと推察した。Gedat や Komori らは、芳香環を有するゲスト分子（例えば *p*-ニトロアニリン）の低封入領域では芳香環の 180° flip-flop 運動が観察されるが、封入量が増えるとゲスト分子同士の相互作用により運動性が下がっている可能性があるという結果^{26, 27)}を報告しており、今回の結果と同様の状況にあると考察した。一方、AS-Py 中の Py は CA-Py と同じ濃度で比較した場合、モノマー発光の比率が高くなった。この結果は Py が P123 のポリマー中の疎水部に単分子で分散され、Py 分子同士の接近が抑制されているのと同時に、PEO 鎖とシリカ壁の相互作用に伴い PPO 鎖の運動性も低下しているため、Py の細孔内での動きが抑制されていると推察した。

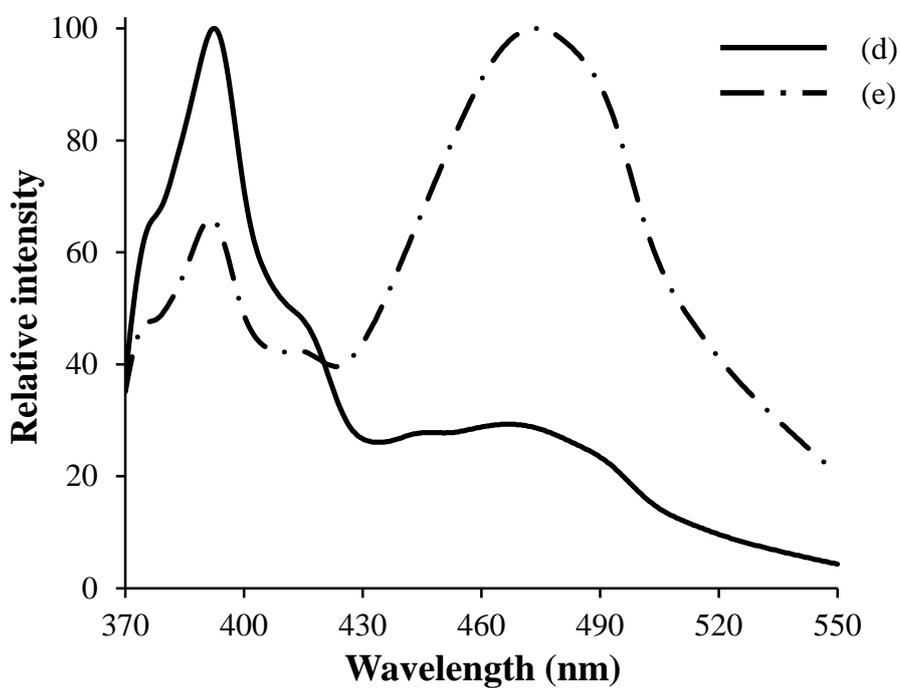
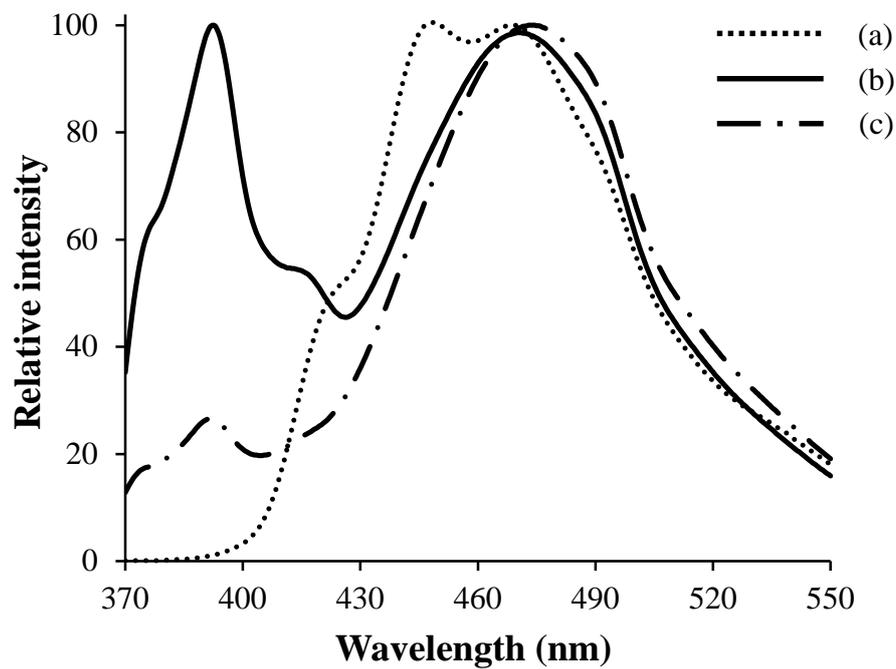


Fig. 13 Solid-state fluorescence emission spectra of (a) Py, (b) AS-Py(1.5%), (c) CA-Py(1.5%), (d) AS-Py(0.45%), and (e) CA-Py(0.45%).

$\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm. Percentages show loaded amount of Py in the samples.

第5節 難水溶性薬物の封入及び物性評価

5-1 ナブメトン封入 MPS 前駆体の調製及び構造評価

ピレンにおける研究結果を基に、難水溶性薬物であり非ステロイド性抗炎症薬であるナブメトン (NBT) を MPS 前駆体に封入させ、構造を評価した。

調製法は Py の場合と同一の方法で行い、NBT を封入した前駆体 (AS-NBT) を得た。AS-NBT は SAXS 測定 (Fig. 14) 及び SEM 観察 (Fig. 15) からヘキサゴナル構造を有していることが確認でき、細孔間隔及び細孔径はそれぞれ 12.5 nm 及び 7.3 nm であった。また、HPLC により算出された AS-NBT の NBT 内封率は 1.53% であった。

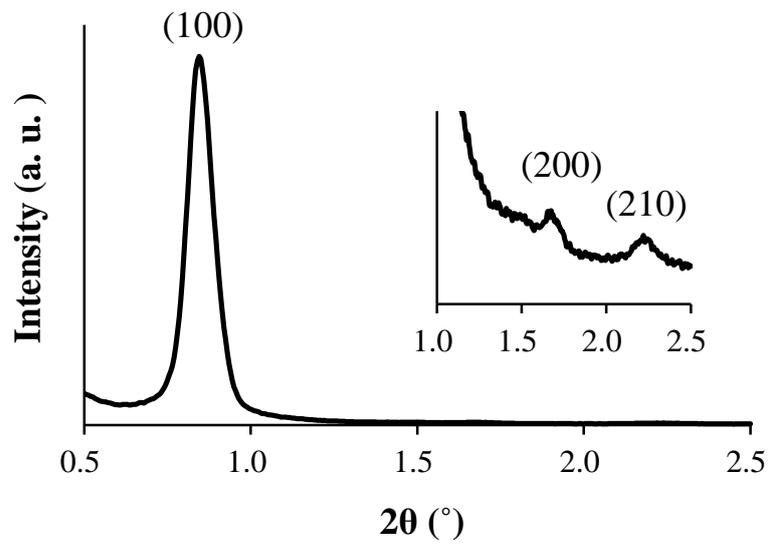


Fig. 14 Small-angle X-ray scattering pattern of AS-NBT.

Inset figures show magnified peaks.

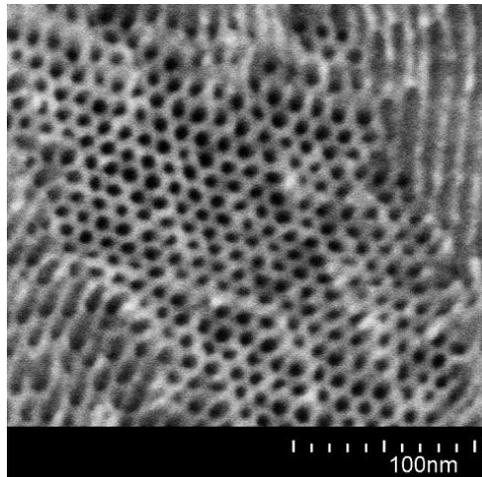


Fig. 15 SEM image of AS-NBT.

5-2 溶出性の評価

AS-NBT、NBT 原薬及び CA-NBT について溶出試験を実施した。溶出試験はパドル法、シンク条件、500 mL、37 °C、50 回転で行った (Fig. 16)。その結果、AS-NBT は試験開始後 5 分で約 80% の NBT が溶出した。一方、NBT 原薬は試験開始後から徐々に溶出していく挙動を示し、CA-NBT は溶出の立ち上がりは早いものの AS-NBT ほど溶出はしていなかった。これは、ゲスト分子が AS に封入される方が CA に封入されるより分子分散されやすいという Py の結果と同様に、NBT でも薬物の分子分散性の高い AS-NBT の方が速い溶出性を示したものと推察した。

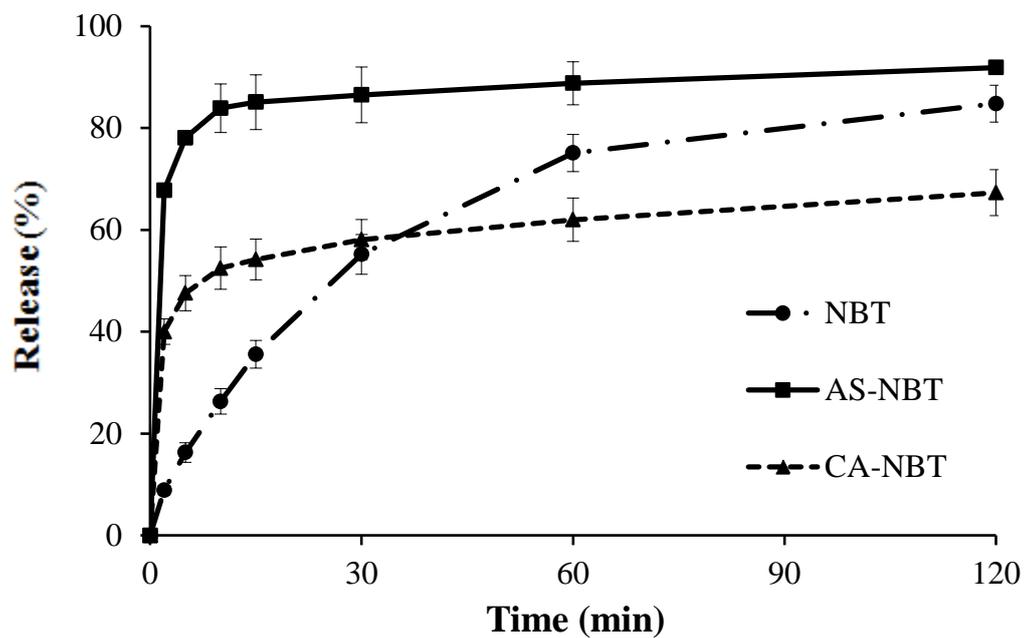


Fig. 16 Dissolution profiles of (●) NBT, (■) AS-NBT, and (▲) CA-NBT in 0.3% SLS solution at 37 °C ($n=3$, mean \pm S.D.).

第6節 結論

ピレンをノニオン系界面活性剤である P123 に予め加えて調製した AS-Py はヘキサゴナル型の細孔構造を有しており、細孔内部は P123 及び Py で満たされていた。AS 中の P123 について ^{13}C DD/MAS NMR で測定したところ、P123 単体及び水溶液中の P123 と比較して分子の運動性は全体的に低いことが明らかとなり、特に PEO 鎖の運動性はシリカ壁に相互作用することにより顕著に低下していた。Py の内封状態については固体蛍光測定を行い、AS-Py 及び CA-Py を比較したところ、同じ封入率の場合では AS-Py の方がモノマーで存在している Py が多いことが示された。Py の封入状態についてシリンダー状の細孔を横から見た模式図を Fig. 17 に示した。最後に、封入するゲスト分子を難水溶性薬物である NBT に適用して AS-NBT を調製し、原薬及び CA-NBT と溶出性を比較したところ、AS-NBT は速い溶出性を示した。以上の結果から MPS 前駆体にゲスト分子を封入することは分子レベルでの分散性向上に寄与すると考えられた。

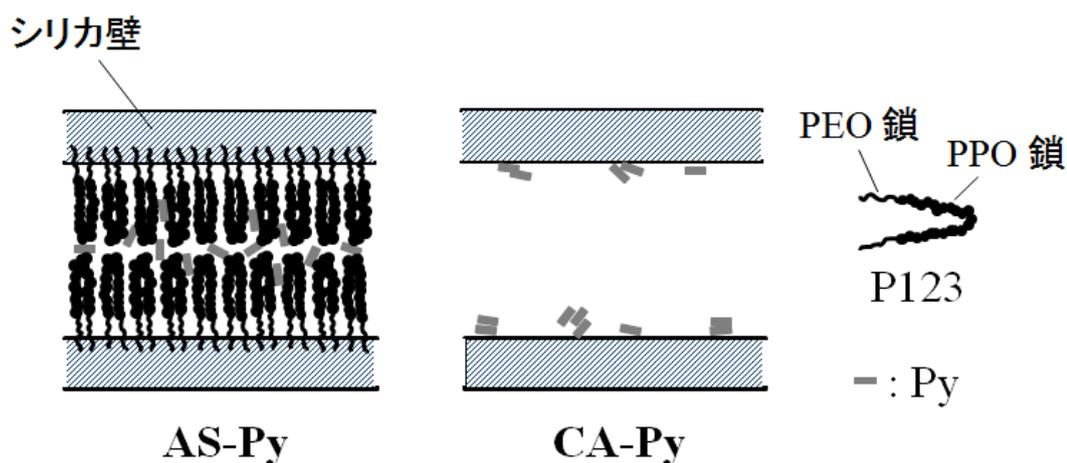
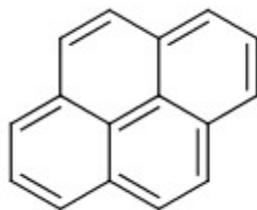


Fig. 17 Schematic representation of molecular states of Py for AS-Py and CA-Py.

実 験 の 部

(1) 試薬

ピレン、ナブメトン、ケイ酸ナトリウム水溶液および塩酸は、和光純薬工業社製を、プルロニック® P123 はシグマ-アルドリッチジャパン社製を購入して使用した。その他、抽出操作および HPLC による定量操作で使用した試薬はすべて試薬特級を使用した。ピレン、ナブメトン及びプルロニック® P123 の構造式及び物性を Fig. 18~ 20 に示した。



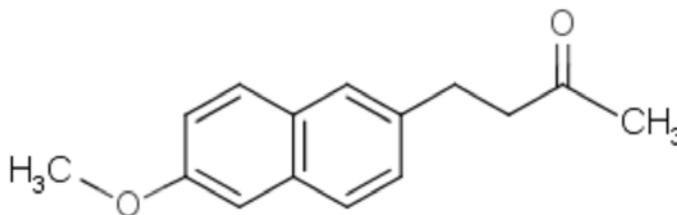
Pyrene

Molecular weight: 202.26

Water solubility: 0.135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at 25 $^{\circ}\text{C}$

Melting point: 156 $^{\circ}\text{C}$

Fig. 18 Chemical structure and physicochemical properties of pyrene.



Nabumetone

Molecular weight: 228.29

Water solubility: 19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at 25 $^{\circ}\text{C}$

Melting point: 79~84 $^{\circ}\text{C}$

Fig. 19 Chemical structure and physicochemical properties of Nabumetone.



Pluronic® P123

Nonionic triblock copolymer

Molecular weight: 5,750

Critical micelle concentration at 37 °C: 4.4 μM (25.3 μg/mL)

Fig. 20 Chemical structure and physicochemical properties of Pluronic® P123.

(2) 試料調製方法

試料の調製は Kosuge らの方法²⁸⁾を参考にして実施した。

Guest-loaded as-synthesized mesoporous silica (AS-Py, AS-NBT)

ピレンもしくはナブメトン 0.18 g 及びプルロニック P123 6.0 g をビーカーに量りとり、70°C に加温・攪拌しながらピレンを溶解させた。放冷後、2 M 塩酸 120 mL を加え攪拌・溶解させた。ここに、ケイ酸ナトリウム溶液 15.3 g を 45 g の脱イオン水に混和させた液を 38 °C で攪拌しながら添加した。この液を 38 °C で 30 分攪拌した後、20 時間静置させた。生じた白色の沈殿物をろ取し、4 °C に冷却した脱イオン水 50 mL で洗浄した後、オーブンにて 40 °C で 20 時間乾燥することで AS-Py もしくは AS-NBT を得た。

Guest -loaded calcined mesoporous silica (CA-Py, CA-NBT)

プルロニック P123 6.0 g をビーカーに量りとり、2 M 塩酸 120 mL を加え攪拌・溶解させた。ここに、ケイ酸ナトリウム溶液 15.3 g を 45 g の脱イオン水に混和させた液を 38 °C で攪拌しながら添加した。この液を 38 °C で 30 分攪拌した後、20 時間静置させた。生じた白色の沈殿物をろ取し、4 °C に冷却した脱イオン水 50 mL で洗浄した後、オーブンにて 40 °C で 20 時間乾燥させ AS を得た。AS をマッフル炉にて 550 °C で 5 時間焼成し、CA を得た。Py もしくは NBT 10.5 mg をアセトニトリル 10 mL に溶解した液を CA 689.5 mg に添加し、室温にて 30 分攪拌させた後、溶媒を留去させ、オーブンにて 40 °C 20 時間乾燥することで CA-Py もしくは CA-NBT を得た。

(3) 測定方法

小角 X 線散乱(SAXS)測定

粉末試料を 1 mm 石英キャピラリーに充填し、窒素雰囲気下、室温で測定を行った。

<装置>

小角 X 線散乱測定装置 NANO-STAR (Bruker AXS 社製)

<測定条件>

Target	: Cu	Filter	: Ni
Voltage	: 50 kV	Current	: 100 mA
Scanning angle (2θ)	: 0.005 ~ 2.5°		

走査型電子顕微鏡(SEM)観察

試料の細孔構造を確認するために SEM 観察を行った。試料は乾式分散にてカーボンテープに撒き観察試料とした。また、前処理としてのスパッタリングは行わず、低加速電圧で観察を行った。

<装置>

電界放出形走査電子顕微鏡 SU-8020 (日立社製)

<測定条件>

Voltage : 1 kv

窒素ガス吸着測定

それぞれの試料について比表面積、細孔体積を求めるため、窒素ガス吸着測定を行った。比表面積の解析には、Brunauer-Emmett-teller (BET)理論を適用し、細孔体積は Barrett-Joyner-Halenda (BJH)法により算出した。

<装置>

TriStar II 3020 (Micromeritics 社製)

<測定条件>

前処理 : 減圧下 40 °C 15 時間 (AS-Py)
減圧下 50 °C 3 時間 (CA-Py)
測定温度 : -196 °C
試料量 : 約 0.3 g

HPLC 測定

<HPLC 装置>

Agilent 1100 series (アジレント・テクノロジー社製)

ポンプ : G1310A
UV 検出器 : G1314A
オートサンプラー : G1313A
カラムオーブン : G1316A
デガッサー : G1322A

<HPLC 測定条件 (Py)>

カラム : L-Column ODS (4.6 mm i.d. × 150 mm、
粒子サイズ 5 μm ; 化学物質評価研究機構製)
カラム温度 : 40 ± 0.5 °C
流速 : 1.0 mL/min
UV 波長 : 254 nm
移動相 : アセトニトリル/精製水 8:2 v/v

<HPLC 測定条件 (NBT)>

カラム : L-Column ODS (4.6 mm i.d. × 150 mm、

粒子サイズ 5 μm ; 化学物質評価研究機構製)
カラム温度 : 40 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$
流速 : 1.0 mL/min
UV 波長 : 254 nm
移動相 : アセトニトリル/精製水/リン酸 600:400:1 v/v

NMR 測定

MPS 前駆体および焼成した MPS について、細孔構造を形成しているシリカの状態を考察するため、固体 ^{29}Si DD/MAS NMR を以下の条件で測定した。

<装置>

JNM-ECX400 unit (日本電子社製)

<測定条件>

磁場	: 9.4 T	周波数	: 79.5 MHz
回転数	: 5 kHz	遅延時間	: 20 秒
積算回数	: 10,000		
基準物質	: ジメチルポリシロキサン		

MPS 前駆体中の P123 および単体の P123 の運動性を考察するため固体 ^{13}C DD/MAS NMR を以下の条件で測定した。

<装置>

JNM-ECA600 unit (日本電子社製)

<測定条件>

磁場	: 14.1 T	周波数	: 150 MHz
回転数	: 5 kHz	遅延時間	: 5 秒
積算回数	: 5,000-10,000	温度	: 25 $^{\circ}\text{C}$, 35 $^{\circ}\text{C}$, 45 $^{\circ}\text{C}$

基準物質 : ヘキサメチルベンゼン (17.3 ppm)

局所的な分子の運動性を評価するため、 ^{13}C - T_1 緩和時間測定を以下の条件で実施した。

<装置>

JNM-ECA600 unit (日本電子社製)

<測定条件>

磁場	: 14.1 T	周波数	: 150 MHz
回転数	: 5 kHz	遅延時間	: 5 秒
積算回数	: 500	サンプリングポイント	: 10
飽和回復時間	: 0.1~20 s (AS) 0.1~5 s (P123 intact)		

P123 を 50 mg/mL の濃度になるように重水で溶解させたものについて溶液 ^{13}C NMR を以下の条件で測定した。

<装置>

JNM-ECA600 unit (日本電子社製)

<測定条件>

磁場	: 14.1 T	周波数	: 150 MHz
回転数	: 15 kHz	遅延時間	: 2 秒
積算回数	: 512	温度	: 25 °C, 35 °C, 45 °C
基準物質	: トリメチルシリルプロパン酸 (TMS)		

溶液中における ^{13}C - T_1 緩和時間測定については以下の条件で実施した。

<装置>

JNM-ECA600 unit (日本電子社製)

<測定条件>

磁場	: 14.1 T	周波数	: 150 MHz
回転数	: 15 kHz	遅延時間	: 2 秒
サンプリングポイント	: 10	積算回数	: 250
飽和回復時間	: 0.1~5 s (P123 D ₂ O solution)		

固体蛍光測定

MPS 前駆体および焼成した MPS に封入されたピレンの固体蛍光スペクトルを測定した。

<装置>

Spectrofluorometer FP-8300 (日本分光社製)

<測定条件>

励起波長	: 355 nm	発光波長	: 392 nm, 471 nm
データ収集範囲	: 370~550 nm	スリット幅	: 5 nm
試料量	: 30 mg		

封入されたピレン及びナブメトンの定量

<AS-Py 及び AS-NBT>

丸底フラスコに AS-Py 50 mg を量りとり、エタノール 20 mL を加え、24 時間還流させる。放冷後、ろ紙でろ過し、ろ過物を再度丸底フラスコに入れ、同じ操作を繰り返す。先のろ液と 2 回目のろ液を合わせて溶媒を留去し、残渣をアセトニトリルで希釈し 20 mL とした液につき HPLC にて定量した。

<CA-Py 及び CA-NBT>

丸底フラスコに CA-Py 50 mg を量りとり、*n*-ヘキサン 20 mL を加え、40 °C で 30 分間攪拌した。この液をろ紙でろ過し、ろ液とろ過物とに分ける。ろ過物をビーカーに入れ、40 mL の 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液を加え、ホモジナイザーにて粒子を破碎した。この懸濁液を分液ロートにて 20 mL の *n*-ヘキサンで 3 回抽出した。先のろ液と抽出液を合わせて溶媒留去し、残渣をアセトニトリルで希釈し 20 mL とした液につき HPLC にて定量した。

ナブメトンの溶出挙動

ナブメトンの溶出挙動を確認するため、JP16 のパドル法に従い、溶出試験装置を用いて測定を行った。薬物 3 mg 相当量を含む AS-NBT、CA-NBT 及び原薬を 0.3% SLS 溶液に投入し、所定の時間に 5 mL ずつサンプリングし、0.1 μm のメンブランフィルターでろ過後、HPLC 法にて薬物濃度を測定した。

< 溶出試験装置 >

溶出試験器 NTR-6100A (富山産業社製)

< 測定条件 >

試験溶液	: 0.3% SLS 溶液 500 mL
測定温度	: 37.0 ± 0.5 °C
パドル回転数	: 50 rpm
サンプリング時間	: 2, 5, 10, 15, 30, 60, 120 min

参考文献

1. C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck, Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism, *Nature*, **359**, 710-712 (1992).
2. S. Inagaki, Y. Fukushima, K. Kuroda, Synthesis and characterization of highly ordered mesoporous material; FSM-16, from a layered polysilicate, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, **84**, 125-132 (1994).
3. K. Shimizu, H. Suzuki, E. Hayashi, T. Kodama, Y. Tsuchiya, H. Hagiwara, Y. Kitayama, Catalytic direct 1,4-conjugate addition of aldehydes to vinylketones on secondary-amines immobilized in FSM-16 silica, *Chem. Commun.*, 1068-1069 (2002).
4. Y. Shin, J. Liu, L. Wang, Z. Nie, W. D. Samuels, G. E. Fryxell, G. J. Exarhos, Ordered hierarchical porous materials: Towards tunable size- and shape-selective microcavities in nanoporous channels, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 2702-2707 (2000).
5. Y. Tozuka, A. Wongmekiat, K. Kimura, K. Moribe, S. Yamamura, K. Yamamoto, Effect of pore size of FSM-16 on the entrapment of flurbiprofen in mesoporous structures, *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 974-977 (2005).
6. M. V. Speybroeck, V. Barillaro, T. D. Thi, R. Mellaerts, J. Martens, J. V.

- Humbeeck, J. Vermant, P. Annaert, G. V. D. Mooter, P. Augustijns, Ordered mesoporous silica material SBA-15: A broad-spectrum formulation platform for poorly soluble drugs, *J. Pharm. Sci.*, **98**, 2648-2658 (2009) .
7. Y. Zhang, T. Jiang, Q. Zhang, S. Wang, Inclusion of telmisartan in mesocellular foam nanoparticles: Drug loading and release property, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **76**, 17-23 (2010).
 8. M. Moritz, M. Łaniecki, SBA-15 mesoporous material modified with APTES as the carrier for 2-(3-benzoylphenyl) propionic acid, *Appl. Surf. Sci.*, **258**, 7523-7529 (2012).
 9. J. M. Xue, M. Shi, PLGA/mesoporous silica hybrid structure for controlled drug release, *J. Control. Release*, **98**, 209-217 (2004).
 10. R. Bongur, N. Marx, C. Marichal, B. Lebeau, P. Guarilloff, Solid-state NMR characterization of phenylbenzimidazolesulfonic acid coencapsulated with cetyltrimethylammonium in mesoporous silica materials, *J. Phys. Chem.*, **114**, 752-759 (2010).
 11. P. Botella, A. Corma, M. Quesad, Synthesis of ordered mesoporous silica templated with biocompatible surfactants and applications in controlled release of drugs, *J. Mater. Chem.*, **22**, 6394-6401 (2012).
 12. T. Fu, L. Guo, K. Le, T. Wang, J. Lu, Template occluded SBA-15: An effective

- dissolution enhancer for poorly water-soluble drug, *Appl. Surf. Sci.*, **256**, 6963-6968 (2010).
13. T. Z. Ren, Z. Y. Yuan, B. L. Su, Direct blue dye-encapsulated mesostructured MCM-41 composites: Microwave-assisted preparation and characterization, *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspect*, **300**, 88-93 (2007).
14. M. Guli, J. Yao, L. Chen, L. Xiao, W. Rao, J. Zhao, Synthesis and characterization of mesoporous composite silica monolith, *Adv. Powder Technol.*, **25**, 1262-1265 (2014).
15. R. Mellaerts, C. A. Arts, J. V. Humbeeck, P. Augustijns, G. V. Mooter, J. A. Martens, Enhanced release of itraconazole from ordered mesoporous SBA-15 silica materials, *Chem. Commun*, 1375-1377 (2007).
16. 柳澤和道, 水熱法によるセラミックス粉末の合成, ニチアス 技術時報, **2**, 1-7 (2008).
17. M. Impéror-Clerc, P. Davidson, A. Davidson, Existence of a microporous corona around the mesopores of silica-based SBA-15 materials templated by triblock copolymers, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11925-11933 (2000).
18. A.V. Kabanov, E. V. Batrakova, V. Y. Alakhov, Pluronic[®] block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery, *J. Control. Release*, **82**, 189-212 (2002).

19. T. Nivaggioli, B. Tsao, P. Alexandridis, T.A. Hatton, Microviscosity in pluronic and tetronic poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles, *Langmuir*, **11**, 119-126 (1995).
20. 寺田勝英、山本恵司、米持悦生、固体医薬品の物性評価、株式会社 じほう、2003, pp. 141-154.
21. P. A. Cybulski, D. J. Gillis, M. C. Baird, ^{95}Mo T_1 measurements of $\text{Mo}(\text{Co})_6$ encapsulated in Na-Y zeolite, *Inorg. Chem.*, **32**, 460-462 (1993).
22. S. Tanabe, K. Higashi, M. Umino, W. Limwikrant, K. Yamamoto, K. Moribe, Yellow coloration phenomena of incorporated indomethacin into folded sheet mesoporous materials, *Int. J. Pharm.*, **429**, 38-45 (2012).
23. T. Yorozu, M. Hoshino, M. Imamura, Fluorescence studies of pyrene inclusion complexes with .alpha.-, .beta.-, and .gamma.-cyclodextrins in aqueous solutions. Evidence for formation of pyrene dimer in .gamma.-cyclodextrin cavity, *J. Phys. Chem.*, **86**, 4426-4429 (1982).
24. E. D. Goddard, N. J. Turro, P. L. Kuo, K. P. Ananthapadmanabhan, Fluorescence probes for critical micelle concentration determination, *Langmuir*, **1**, 352-355 (1985).
25. K. Yamamoto, K. Saito, H. Kawashima, E. Yonemochi, T. Oguchi, Y. Nakai,

Molecular states of pyrene in the ground mixtures with cyclodextrins studied by fluorescence spectroscopy, *NIPPON KAGAKU KAISHI*, **10**, 1141-1147 (1993).

26. E. Gedat, A. Schreiber, J. Albrecht, Th. Emmler, I. Shenderovich, G. H. Findenegg, H. -H. Limbach, G. Buntkowsky, ^2H -solid-state NMR study of benzene- d_6 confined in mesoporous silica SBA-15, *J. Phys. Chem. B*, **106**, 1977-1984 (2002).
27. Y. Komori, S. Hayashi, Solid-state NMR study on dynamics of *p*-nitroaniline molecules in FSM-type mesoporous silicas at high loading levels, *Micropor. Mesopor. Mater.*, **91**, 92-99 (2006).
28. K. Kosuge, T. Sato, N. Kikukawa, M. Takemori, Morphological control of rod- and fiberlike SBA-15 type mesoporous silica using water-soluble sodium silicate, *Chem. Mater.*, **16**, 899-905 (2004).

謝 辞

終りに臨み、終始御懇切な御指導ならびに御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院教授 森部久仁一先生に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、有益な御指導ならびに御助言を賜りました千葉大学大学院薬学研究院名誉教授 山本恵司先生に心より厚く御礼申し上げます。

また、本研究完成に至るまで、御指導ならびに御助言を賜りました千葉大学大学院薬学研究院講師 東颯二郎先生に心より厚く御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、御助言ならびに御協力下さいました Mahidol 大学講師 Waree Limwibrant 先生、製剤工学研究室 黒岩洋佑氏ならびに片井寛明氏に心より感謝申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、御協力下さいました製剤工学研究室の皆様心より感謝いたします。

本研究の機会をお与え頂きましたエスエス製薬株式会社代表取締役会長 鳥居正男氏、同代表取締役社長 石橋利哉氏、同執行役員 入山公成氏、同元執行役員 坂井裕貴氏、同元ライフサイエンスインスティテュート所長 今森勝美博士ならびに村田豊氏に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、絶えざる御助言、御協力を頂きましたエスエス製薬株式会社 池田保夫博士、伏見升成博士、宮台信男博士、小貫洋一博士、大澤瑞穂博士、岡田実博士、林哲男博士、廣田浩之氏ならびに成田研究所の諸氏に深く感謝いたします。

最後に、終始暖かく見守り、支えてくれた妻 千夏、娘 千尋ならびに優衣、息子 恒忠に感謝いたします。

論文目録

主論文

1. R. Chiba, Y. Kuroiwa, K. Higashi, K. Yamamoto, K. Moribe, Characterization of as-synthesized mesoporous silica using NMR and solid-state fluorescence spectroscopy, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, **24**, 673-677 (2014)

主査、副査名

本学位論文は千葉大学大学院医学薬学府で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 戸井田 敏彦

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 工学博士 根矢 三郎

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 公衆衛生学博士 山下 純