

加熱溶融混練・アニール連続処理による
高品質なOTC薬物ナノ結晶製剤調製法の確立

千葉大学大学院薬学研究院

うえだ けいすけ
植田 圭祐

加熱溶融混練・アニール連続処理による 高品質な OTC 薬物ナノ結晶製剤調製法の確立

千葉大学大学院薬学研究院 植田 圭祐

(〒 260-8675 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1 Tel. 043-226-2866)

要旨

本研究では、加熱混練法による薬物ナノ結晶形成メカニズムの解明を行い、高品質な薬物ナノ結晶製剤設計指針を得ることを目的として実験を行った。難水溶性モデル薬物として glibenclamide (GLB) を用い、混練温度及び混練速度を変化させて PVP と SDS と加熱混練を行うことで各種加熱混練物 (HE) を調製した。HE 中の GLB の結晶化度を固体 NMR 測定により評価した結果、混練回数の増加に伴い GLB の結晶化度が減少した。また、混練温度の増加に伴い、HE 中の GLB 結晶化度が減少した。混練温度の増加により、試料に加わる熱が増加し、GLB の非晶質化が進行したと考察した。各 HE を水に分散し GLB ナノ粒子形成能を比較評価した結果、混練回数の増加に伴い HE 懸濁液中の GLB ナノ粒子濃度が増大した。GLB は加熱混練中に、熱により可塑化したポリマーへの溶け込みと機械によるせん断力を受ける。そのため、混練回数の増加により HE 中の GLB の結晶径が減少し、水分散後の GLB ナノ結晶形成量が増大したと考察した。一方、GLB の結晶化度が 20% 以下である HE の懸濁液では、過剰な非晶質 GLB の過飽和溶解により、水分散時に急激な結晶成長が引き起こされ、GLB 粒子径が増大した。これらの結果から、薬物非晶質化を抑制しつつ薬物結晶を微細化することが、水分散時のナノ結晶形成に重要であることが明らかとなった。同等の GLB 結晶化度を示す HE の比較より、非晶質化を抑制しつつ、GLB 結晶の微細化を促進するためには、低い混練温度かつ高いスクリー回転数を用いて加熱混練処理を行うことが重要であることが示された。本研究結果より、薬物のナノ結晶化メカニズムに基づく加熱混練条件の最適化により高品質な薬物のナノ結晶製剤の調製が可能であることが示され、加熱混練技術による難水溶性 OTC 医薬品の経口製剤化が期待される。

1、調査研究目的

近年、多くの薬物が難水溶性を示し、経口投与製剤としての開発が断念されるケースが増加している [1-3]。OTC 薬として広く市販されているイブプロフェンやエテンザミド等

の薬物も低い水への溶解性を示す。そのため、製剤技術による難水溶性薬物の溶解性改善が求められており、固体分散体化、界面活性剤による可溶化、co-crystal の調製、ナノ結晶化など様々な手法が提唱され、研究されている。

薬物のナノ結晶化は、近年注目されている薬物溶解性改善手法の一つである [4, 5]。粒子サイズの減少に伴う比表面積の増大により、薬物の溶出速度が改善され [6]、粒子サイズが 100 nm 以下になることで、薬物の溶解度上昇も認められる [7]。現在検討されている薬物ナノ結晶の調製法としては、トップダウン的アプローチとして乾式粉碎法 [8, 9] 及び湿式粉碎法 [10, 11]、ボトムアップ的アプローチとして晶析法 [12, 13] が用いられている。既存の薬物ナノ結晶調製法は、その原理・装置の構成からそれぞれ製剤化における問題点を有する。例えば乾式粉碎装置として、ボールミル、ロッドミルが挙げられるが [14]、いずれもバッチ式であるためスケールアップが困難であり実用化が難しい [15]。湿式粉碎装置としてはビーズミル及び高圧ホモジナイザーが主に用いられており [16]、連続式であるため大量生産は可能であるが、得られる試料が懸濁液であるため、水に不安定な物質に適用できない [17]。また、固形製剤を得るために乾燥工程が必要であり、乾燥工程前後における薬物ナノ結晶の凝集が問題となる [18]。ボトムアップ的アプローチでは、薬物の粒子径制御が大変難しいという問題がある [19]。また、有機溶媒を用いる必要があり、有機溶媒を取り除くために高額なコストがかかるため実用的でない [20]。

これらの問題点を解決する目的で、当研究室ではこれまでに新規薬物ナノ結晶調製法の開発を行い、加熱溶融混練機を用いた薬物ナノ結晶調製法を確立し、特許を取得した (WO2017098729A1)。加熱混練法は、19 世紀にプラスチック産業で発展した技術である。最近では医薬品産業でも注目を集めており、1980 年以降から、医薬品に関わる特許数が増加している [21, 22]。製剤化における加熱混練法の主な工程は、供給された薬物と熱可塑性添加剤との混合物を加熱し、混練しながら混練物を輸送、試料を高いせん断力で混練し、用途に合わせた形状をしたダイを通して押し出し成形する [23]。これまでの報告で、薬物 / 高分子担体 / 界面活性剤 3 成分混合物を加熱溶融混練処理することで、様々な薬物のナノ結晶化に成功している。しかし、加熱溶融混練時に薬物が一部非晶質化することが認められており、加熱溶融混練処理のみでは長期保存安定性を有する高品質な薬物ナノ結晶製剤を調製することができていない。高い薬物結晶性を有し、高い保存安定性を示す薬物ナノ結晶の調製には、加熱混練過程における薬物のナノ結晶化メカニズムにも基づく加熱混練条件の最適化が必要である。本研究では、加熱混練法による薬物ナノ結晶形成メカニズムの解明を行い、高品質な薬物ナノ結晶製剤設計指針を得ることを目的として実験を行った。

2、調査研究方法

2-1. 試薬

難水溶性薬物のモデルとして Glibenclamide (GLB; Mw 494.01) を用いた。GLB 及び Sodium dodecyl sulfate (SDS; Mw 288.38) は Wako Chemicals Co., (Tokyo, Japan) から購入した。また、GLB を dichloromethane/methanol = 1:1 (v/v) 溶液に 5% (w/v) の濃度で溶解させ、90°C で噴霧乾燥を行うことで非晶質 GLB を調製した。Polyvinylpyrrolidone K12 (PVP; Mw ≈ 2,500) は BASF (Ludwigshafen, Germany) より提供を受けた。その他の試薬については試薬特級のものを用いた。各化合物の構造式を Figure 1 に示す。

2.2. 試料調製

2.2-1. 加熱混練物 (Hot extrudate; HE)

GLB、PVP 及び SDS を質量比 3:6:1 で、ボルテックスミキサーを用いて 5 分間混合することにより物理的混合物 (PM) を調製した。各 PM を調製温度 90、115、130 及び 140°C、スクリー回転数 10 及び 350 rpm、処理回数 1-5 回の条件で共回転二軸加熱溶融混練機 (HAKKE Minilab II, Thermo Fisher Scientific, Inc., Karlsruhe, Germany) を用いて加熱混練処理を行った。得られたペレットを 4°C で 5 分間、振動型ボールミル (MM400, Verder Scientific, Co., Ltd., Haan, Germany) を用いて粉碎し、100 メッシュの篩を篩過した試料を HE とした。以降の文章では、HE (調製温度, スクリー回転数, 処理回数) と表す。

2.2-1. 噴霧乾燥試料 (Spray-dried sample; SPD)

GLB 単独試料及び PM を dichloromethane/methanol = 1:1 (v/v) 溶液に 5% (w/v) の濃度で溶解させた。調製した溶液を ADL311S (Yamato Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて噴霧乾燥を行い、SPD を調製した。噴霧条件は以下の通りである。Inlet temperature: 90°C; atomizing pressure: 0.05 MPa; feeding rate: 5 g/min.

2.3. 測定方法

2.3-1. 粉末 X 線回折測定

Bruker D8 ADVANCE (Bruker AXS, Karlsruhe, Germany) を用いて粉末 X 線回折 (PXRD) 測定を行った。以下の条件において測定を行った。Target: Cu; voltage: 40 kV; current: 40 mA; step size: 0.02°; scanning angle: 5-30°; counting per step: 0.75s.

2.3-2. 固体 NMR 測定

JNM-ECX 400 (JEOL Resonance Co., Ltd., Tokyo, Japan; 外部磁場: 9.39 T) を用い、固体 ¹³C NMR 測定を行った。測定シーケンスは、magic angle spinning (MAS) 条件下において、cross polarization (CP) 法を用いた。外部標準として hexamethylbenzene を用い、メチン基のピークを 17.3 ppm としてケミカルシフト値を算出した。測定条件は以下のと

おりである。Contact time: 2 ms; relaxation delay: 4 s; spinning rate: 15 kHz.

2-3-3. 粒度分布測定

MICROTRAC 9340-UPA (MicrotracBEL Corp., Japan ; measurement range : 0.0008-6.5 μ m) 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。

2-3-4. GLB 溶解度及びナノ粒子形成量の評価

各種懸濁液を 100,000 \times g で 25 $^{\circ}$ C、1 時間遠心処理した上清について、HPLC を用いて GLB 溶解度を評価した。また、試料を 25 $^{\circ}$ C、1,000 及び 21,500 \times g で 30 分間遠心処理した上清についても同様に HPLC により GLB 量を定量し、ナノ粒子形成量を評価した。

2-3-5. HPLC 測定

各種試料溶液を acetonitrile で希釈し、HPLC 用の試料とした。移動相には acetonitrile/ phosphate buffer (pH 6.8) = 1/1 (v/v) を用い、intakt ODS column (3 mm, 150 mm \times 4.6 mm) で分離を行った。試料注入量 10 μ L、流速 1 mL/min、及びカラム温度 40 $^{\circ}$ C の条件下で UV 検出機 (229 nm) を用いて GLB 濃度を測定した。

2-3-6. クライオ透過型電子顕微鏡 (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。microperforated copper grid (Nisshin EM Co. Ltd., Tokyo, Japan) を HDT-400 (JEOL Co., Ltd., Japan) により 40 秒間親水化処理した後、各種試料液 2 μ L 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 以下の温度を維持して TEM 測定を行った。

3. 調査研究成果および考察

3-1. 加熱混練物中の glibenclamide の物性評価

加熱混練条件が HE 中の GLB の分子状態に及ぼす影響を評価することを目的として、PXRD 測定を行った。Figure 2 には各 HE の PXRD パターンを示す。全ての HE において、GLB 結晶由来の回折ピークが確認された。この結果より、今回調製した全ての HE 中に GLB 結晶が残存していることが示された。また HE 中で確認された GLB 結晶に由来する回折ピークは、PM で確認される GLB 結晶由来の回折ピークと比較して広域化が認

められた。薬物結晶の結晶子サイズの減少、非晶質化及びその両方により薬物結晶由来の X 線回折ピークが広域化することが報告されている [24, 25]。そのため、加熱混練処理により PVP 中で GLB 結晶のサイズ減少、非晶質化あるいはその両方が引き起こされ、結晶由来の回折ピークが広域化したと考察した。

HE 中の GLB の更なる詳細な分子状態を評価する目的で固体 ^{13}C CP/MAS NMR 測定を行った。GLB 原薬結晶、GLB SPD、PM、HE (90, 350, 1-5)、及び GLB/PVP/SDS SPD について、低磁場側のカルボニルピークに由来するピークの拡大図を Figure 3 に示す。GLB 結晶と比較して GLB を単独噴霧した試料においてはピークのブロード化及び高磁場側シフトが認められた。この変化は、アミド-イミド酸の互変異性を伴う GLB の非晶質化に由来するものと考えられた。一方、すべての HE において GLB 結晶及び非晶質に由来するピークが認められた。この結果から、HE 中に GLB 結晶と非晶質が混在していることが示された。また、調製条件の違いにより、HE 中の GLB のピーク形状に違いが認められた。これは、調製条件の異なる HE 中の GLB 非晶質量に違いがあるためであると考えられた。PVP の C=O に由来するピークと GLB 非晶質の C=O に由来するピークの相対強度比から HE 中の GLB の結晶化度を算出した。Figure 4 には各 HE 中の GLB 結晶化度を示す。調製温度及びスクリー回転数が同じかつ処理回数異なる HE の GLB の結晶化度を比較すると、処理回数の増加に伴い、HE 中の GLB の結晶化度が減少していることが認められた。また、スクリー回転数及び処理回数同じかつ調製温度異なる HE の結晶化度を比較すると、調製温度の増加に伴い、GLB の結晶化度の減少が認められた。GLB は加熱混練中に、熱により可塑化したポリマーへ溶け込み、機械によるせん断力を受ける。そのため、調製温度や処理回数の増加に伴い、GLB に加わるエネルギーが増加し、非晶質化が進行し、GLB の結晶化度が減少したと考察した。

3-2. 加熱混練物懸濁液の物性評価

動的光散乱法を用いて各 HE 懸濁液の粒子径測定を行った。Table 1 に調製直後及び 25°C 条件下で 4 時間静置保存後の PM 及び HE 懸濁液の体積平均径を示す。PM 懸濁液においては、水分散直後から沈殿物の形成が認められた。一方、水分散直後の HE 懸濁液では、全ての試料において平均粒子径 500 nm 以下のナノ粒子の形成が認められた。この結果より、PVP と SDS との加熱混練により GLB がナノ粒子化したことが示された。HE (90, 10, 1)、(90, 350, 1-4)、(115, 10, 1)、(115, 350, 1-4) 及び (130, 350, 1) 懸濁液においては、4 時間静置後にも、粒子径に大きな変化は認められず、調製されたナノ粒子の高い分散安定性が認められた。これらの HE 懸濁液の粒子径を比較したところ、調製温度及び処理回数の増加に伴い、平均粒子径が減少することが認められた。このことから、GLB 結晶は加熱混練中に加わるエネルギーにより、徐々に粒子径が減少していくと考えられた。一方、HE (90, 350, 5)、(115, 350, 4)、(130, 10, 1)、(130, 350, 2) 及び (140, 350, 1) 懸濁液においては、4 時間静置保存後に沈殿物の形成が認められた。4 時間静置後に沈殿物の形成が確認

された試料においては、先ほどの固体 NMR 測定の結果から (Figure 4)、HE 中の GLB の結晶化度が 20% 以下であることが認められている。過去の報告において Nifedipine (NIF)/PVP/SDS 混合粉砕物中に含まれる NIF の非晶質により、NIF ナノ粒子の形成が不利に働くことが報告されている [26]。これらの結果より、HE 中に含まれる過剰な非晶質 GLB が水分散後に急激な結晶成長を引き起こし、GLB 粒子径が増大したと考えられた。このことから、分散安定性の高いナノ粒子を調製するためには、HE 中の GLB 非晶質量を制御することが必要であることが示された。こ

動的光散乱法で様々なサイズの粒子を含む溶液を測定した際、より小さい粒子は過小評価されるため、粒子サイズ分布や各分画ナノ粒子量の定量的評価が困難である。そのため、遠心分離処理を用いて、各サイズ分画中の GLB ナノ結晶の定量を行った。1,000 及び 21,500 × g で遠心分離した後の HE (90 10, 1) 懸濁液の粒度分布図を Figure 5 に示す。1,000 及び 21,500 × g で遠心分離した HE 懸濁液の粒度分布は、それぞれ 150 nm 及び 50 nm の平均粒子径を示した。1,000 × g で遠心分離した HE 懸濁液中には GLB の溶解成分及び 150 nm 以下の GLB 粒子が含まれている。一方、21,500 × g で遠心分離した HE 懸濁液中には GLB の溶解成分及び 50 nm 以下の GLB 粒子が含まれていることが示された。また、HE 懸濁液を 100,000 × g で超遠心分離を行い、上清中から粒子を完全に除去した後、HPLC 測定を行い、懸濁液中の GLB 溶解濃度を評価した。1,000 及び 21,500 × g で遠心分離後の上清中の GLB 濃度定量と GLB 溶解濃度定量の結果を合わせて、各懸濁液中の薬物ナノ粒子分画をそれぞれ定量した (Figure 6)。PM 懸濁液において、GLB ナノ粒子分画はほとんど認められず大部分の GLB が PM 懸濁液中で大きな結晶の沈殿物として分散していることが示された。HE 懸濁液においては、混練条件の違いに依存して、HE 懸濁液中の GLB ナノ粒子濃度に差が認められた。スクリー回数及び処理回数が同じであり、調製温度が異なる HE の各分画中の GLB 濃度を比較した。調製温度の増加に伴い、多くの HE 懸濁液において GLB ナノ粒子濃度の増加が確認された。これは調製温度の増加に伴い、加熱混練中に試料に加わるエネルギーが増大し、HE 中の GLB 結晶の粒子径減少が進行し、水分散後に形成する GLB ナノ結晶形成量の増大をもたらしたと考えられた。しかし、一部の HE 懸濁液においては、調製温度の増加に伴い、GLB ナノ粒子濃度の減少が認められた。また SPD 懸濁液においても GLB ナノ粒子量が HE 懸濁液と比較して少ないことが認められた。加熱混練過程において、GLB は結晶径の減少とともに非晶質化も進行しており、過剰な GLB 非晶質は急激な GLB 結晶成長を引き起こす。特に試料中の GLB 結晶性が 20% 以下の試料において GLB ナノ粒子量の減少が認められた。調製温度の増加に伴い、HE 中の GLB 非晶質量が増大し、HE の水分散時に GLB 結晶径の増大が引き起こされたと考察した。同様に GLB が非晶質状態で存在している SPD の懸濁液中においても GLB 粒子の急激な成長が起こったと考察した。

次に、調製温度及びスクリー回数が同じであり、処理回数が異なる HE の各分画中の GLB 濃度を比較した。処理回数の増加に伴い、多くの HE 懸濁液において GLB ナノ粒子

濃度の増加が確認された (Figure 5)。これは処理回数の増加に伴い、HE 中の GLB 粒子径が徐々に減少し、水分散後の GLB ナノ結晶形成に寄与したと考えられた。しかし、一部の HE 懸濁液においては、処理回数の増加に伴い、各分画中の GLB 濃度の減少が認められた。これは処理回数の増加に伴い、HE 中の GLB 非晶質化が過剰に進行し、水分散時に急激な GLB 結晶成長を引き起こしたためと考察した。

HE 懸濁液中に分散する GLB 結晶の形態を評価する目的で Cryo-TEM 測定を行った。HE (90, 350, 1-5) の水分散直後の Cryo-TEM 像を Figure 7 に示す。HE (90, 350, 1) 及び HE (90, 350, 5) 懸濁液中では、楕円形の粒子が観察された。一方、HE (90, 350, 2-4) 懸濁液中には、球形に近い粒子が観察された。また、一部で二次凝集をおこなっている粒子も観察された。HE (90, 350, 1-4) 懸濁液では、処理回数の増加に伴い、一次粒子径が約 300 nm から 30 nm まで減少することが認められた。しかし、HE (90, 350, 5) 懸濁液においては、HE (90, 350, 4) 懸濁液と比較して一次粒子径の増大が認められた。これは、HE (90, 350, 5) 中に含まれる過剰な GLB 非晶質が水分散時に一時高い過飽和を形成し、その後急激な結晶化を引き起こし、GLB 粒子の一次粒子の成長を促したと考察した

3-3. 加熱混練条件が GLB ナノ結晶形成に与える影響の考察

HE 中の GLB 結晶化度に基づいて、調製温度及びスクリュウ回転数が GLB ナノ結晶形成に与える影響を評価した。Figure 8 には、様々な加熱混練条件により調製した薬物ナノ結晶の形成メカニズムを示す。まず、調製温度が GLB ナノ結晶形成に与える影響を評価した。スクリュウ回転数及び GLB 結晶化度が同等である、HE (90, 350, 2)・HE (115,350, 1)、HE (90, 350, 3)・HE (115, 350, 2) 及び HE (115, 350, 3)・HE (130, 350, 1) の 3 通りの組み合わせの GLB ナノ結晶形成量を比較した (Figure 6)。その結果、すべての組み合わせにおいて、調製温度の低い HE においてナノ結晶形成量が多いことが認められた。調製温度の低下に伴い、GLB は可塑化したポリマーへの溶け込みが抑えられ、よりスクリュウと添加剤によるせんだん力を受けると考えられる。そのため、調製温度が低い条件では、調製温度が高い条件と比較して、GLB の非晶質化を抑制しつつ、効率よく GLB 結晶の微細化が促進したと考えられた。次に、スクリュウ回転数が GLB ナノ結晶形成に与える影響を評価した。調製温度及び GLB 結晶化度が同等である、HE (90, 10, 1)・HE (90, 350, 2) 及び HE (115, 10, 1)・HE (115, 350, 2) の 2 通りの組み合わせの GLB ナノ結晶量を比較した (Figure 6)。その結果、すべての組み合わせにおいて、スクリュウ回転数の高い HE においてナノ結晶形成量が多いことが認められた。スクリュウ回転数の増加に伴い、加熱混練中に GLB に加わるせんだん力が増加すると考えられる。そのため、スクリュウ回転数が高い条件では、スクリュウ回転数が低い条件と比較して、効率よく GLB 結晶の微細化が促進したと考えられた。これらの結果より、非晶質化を抑制しつつ、GLB 結晶の微細化を促進するためには、低い調製温度かつ高いスクリュウ回転数を用いて加熱混練処理を行うことが重要であることが示された。

4、まとめ

加熱溶融混練装置を用いて、GLB ナノ結晶の調製に成功した。また、加熱混練条件に依存して、GLB 粒子径及びナノ結晶形成量に違いがあることを見出した。HE 中の過剰な GLB 非晶質は、水分散時に急激な GLB 結晶成長を引き起こすことが認められた。そのため、薬物非晶質量を制御した上での薬物結晶の微細化が水分散時のナノ結晶形成に重要であると考察した。また、加熱混練条件が GLB ナノ結晶形成量に与える影響を解明した。非晶質化を抑制しつつ、GLB 結晶の微細化を促進するためには、低い調製温度かつ高いスクリーニング回転数を用いて加熱混練処理を行うことが重要であった。

本研究の検討は、加熱溶融混練装置の特性から、既存の薬物ナノ結晶調製法の欠点を克服する調製法となる。今後、更なる薬物及び添加剤を用いることで、様々な薬物のナノ結晶調製が可能になることが期待される。本研究で得られた結果は、OTC 製剤を含む速放性を指向した製剤設計に重要な知見を与えると期待される。

5、調査研究発表(口頭または誌上発表)

該当なし(本研究内容について国際投稿論文の投稿準備中である)

6、引用文献

- [1] Kawabata, Y.; Wada, K.; Nakatani, M.; Yamada, S.; Onoue, S., Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *International Journal of Pharmaceutics* 2011, 420 (1), 1-10.
- [2] Williams, H. D.; Trevaskis, N. L.; Charman, S. A.; Shanker, R. M.; Charman, W. N.; Pouton, C. W.; Porter, C. J. H., Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. *Pharmacological Reviews* 2013, 65 (1), 315.
- [3] Hauss, D. J., Oral lipid-based formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007, 59 (7), 667-676.
- [4] Pawar, V. K.; Singh, Y.; Meher, J. G.; Gupta, S.; Chourasia, M. K., Engineered nanocrystal technology: In-vivo fate, targeting and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2014, 183, 51-66.
- [5] Karashima, M.; Kimoto, K.; Yamamoto, K.; Kojima, T.; Ikeda, Y., A novel solubilization technique for poorly soluble drugs through the integration of nanocrystal and

- cocrystal technologies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2016, 107, 142-150.
- [6] Brough, C.; Williams Iii, R. O., Amorphous solid dispersions and nano-crystal technologies for poorly water-soluble drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2013, 453 (1), 157-166.
- [7] Liu, G.; Zhang, D.; Jiao, Y.; Guo, H.; Zheng, D.; Jia, L.; Duan, C.; Liu, Y.; Tian, X.; Shen, J.; Li, C.; Zhang, Q.; Lou, H., In vitro and in vivo evaluation of riccardin D nanosuspensions with different particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013, 102, 620-626.
- [8] Niwa, T.; Nakanishi, Y.; Danjo, K., One-step preparation of pharmaceutical nanocrystals using ultra cryo-milling technique in liquid nitrogen. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010, 41 (1), 78-85.
- [9] Pongpeerapat, A.; Wanawongthai, C.; Tozuka, Y.; Moribe, K.; Yamamoto, K., Formation mechanism of colloidal nanoparticles obtained from probucol/PVP/SDS ternary ground mixture. *International Journal of Pharmaceutics* 2008, 352 (1-2), 309-316.
- [10] Van Eerdenbrugh, B.; Van den Mooter, G.; Augustijns, P., Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. *International Journal of Pharmaceutics* 2008, 364 (1), 64-75.
- [11] Afolabi, A.; Akinlabi, O.; Bilgili, E., Impact of process parameters on the breakage kinetics of poorly water-soluble drugs during wet stirred media milling: A microhydrodynamic view. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014, 51, 75-86.
- [12] Sinha, B.; Müller, R. H.; Möschwitzer, J. P., Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: Formulations and factors affecting particle size. *International Journal of Pharmaceutics* 2013, 453 (1), 126-141.
- [13] Hu, J.; Ng, W. K.; Dong, Y.; Shen, S.; Tan, R. B. H., Continuous and scalable process for water-redispersible nanoformulation of poorly aqueous soluble APIs by antisolvent precipitation and spray-drying. *International Journal of Pharmaceutics* 2011, 404 (1-2), 198-204.
- [14] Gupta, V. K.; Patel, J. P., A one-parameter model for describing the residence time distribution of closed continuous flow systems characterized by nonlinear reaction kinetics: Rod and ball mills. *Powder Technology* 2015, 274, 163-172.
- [15] Dhumal, R. S.; Kelly, A. L.; York, P.; Coates, P. D.; Paradkar, A., Cocrystalization and Simultaneous Agglomeration Using Hot Melt Extrusion. *Pharmaceutical Research* 2010, 27 (12), 2725-2733.
- [16] Mauludin, R.; Müller, R. H.; Keck, C. M., Development of an oral rutin nanocrystal

- formulation. *International Journal of Pharmaceutics* 2009, 370 (1-2), 202-209.
- [17] Gurram, R. K.; Gandra, S.; Shastri, N. R., Design and optimization of disintegrating pellets of MCC by non-aqueous extrusion process using statistical tools. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016, 84, 146-156.
- [18] Gao, L.; Liu, G.; Ma, J.; Wang, X.; Zhou, L.; Li, X.; Wang, F., Application of Drug Nanocrystal Technologies on Oral Drug Delivery of Poorly Soluble Drugs. *Pharmaceutical Research* 2013, 30 (2), 307-324.
- [19] de Waard, H.; Hinrichs, W. L. J.; Frijlink, H. W., A novel bottom-up process to produce drug nanocrystals: Controlled crystallization during freeze-drying. *Journal of Controlled Release* 2008, 128 (2), 179-183.
- [20] Müller, R. H.; Gohla, S.; Keck, C. M., State of the art of nanocrystals – Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2011, 78 (1), 1-9.
- [21] Crowley, M. M.; Zhang, F.; Repka, M. A.; Thumma, S.; Upadhye, S. B.; Kumar Battu, S.; McGinity, J. W.; Martin, C., Pharmaceutical Applications of Hot-Melt Extrusion: Part I. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2007, 33 (9), 909-926.
- [22] Baronsky-Probst, J.; Möltgen, C. V.; Kessler, W.; Kessler, R. W., Process design and control of a twin screw hot melt extrusion for continuous pharmaceutical tamper-resistant tablet production. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016, 87, 14-21.
- [23] Breitenbach, J., Melt extrusion: from process to drug delivery technology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2002, 54 (2), 107-117.
- [24] Dujardin, N.; Willart, J. F.; Dudognon, E.; Danède, F.; Descamps, M., Mechanism of Solid State Amorphization of Glucose upon Milling. *The Journal of Physical Chemistry B* 2013, 117 (5), 1437-1443.
- [25] Crowley, K. J.; Zografi, G., Cryogenic grinding of indomethacin polymorphs and solvates: Assessment of amorphous phase formation and amorphous phase physical stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002, 91 (2), 492-507.
- [26] Ueda, K.; Higashi, K.; Moribe, K., Application of Solid-State NMR Relaxometry for Characterization and Formulation Optimization of Grinding-Induced Drug Nanoparticle. *Molecular Pharmaceutics* 2016, 13 (3), 852-862.

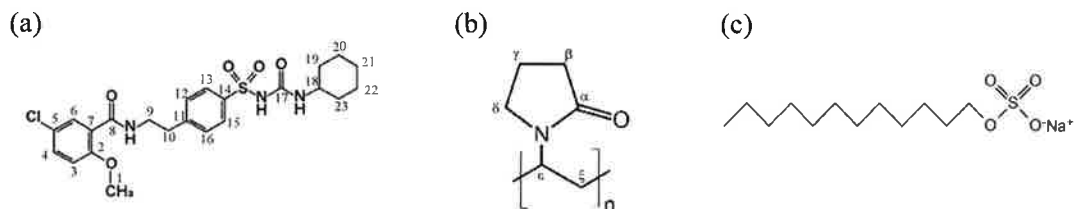


Figure 1. Chemical structures of (a) glibenclamide (GLB), (b) polyvinylpyrrolidone (PVP) and (c) sodium dodecyl sulfate (SDS). Carbon numberings of GLB and PVP represent peak assignment in NMR spectra.

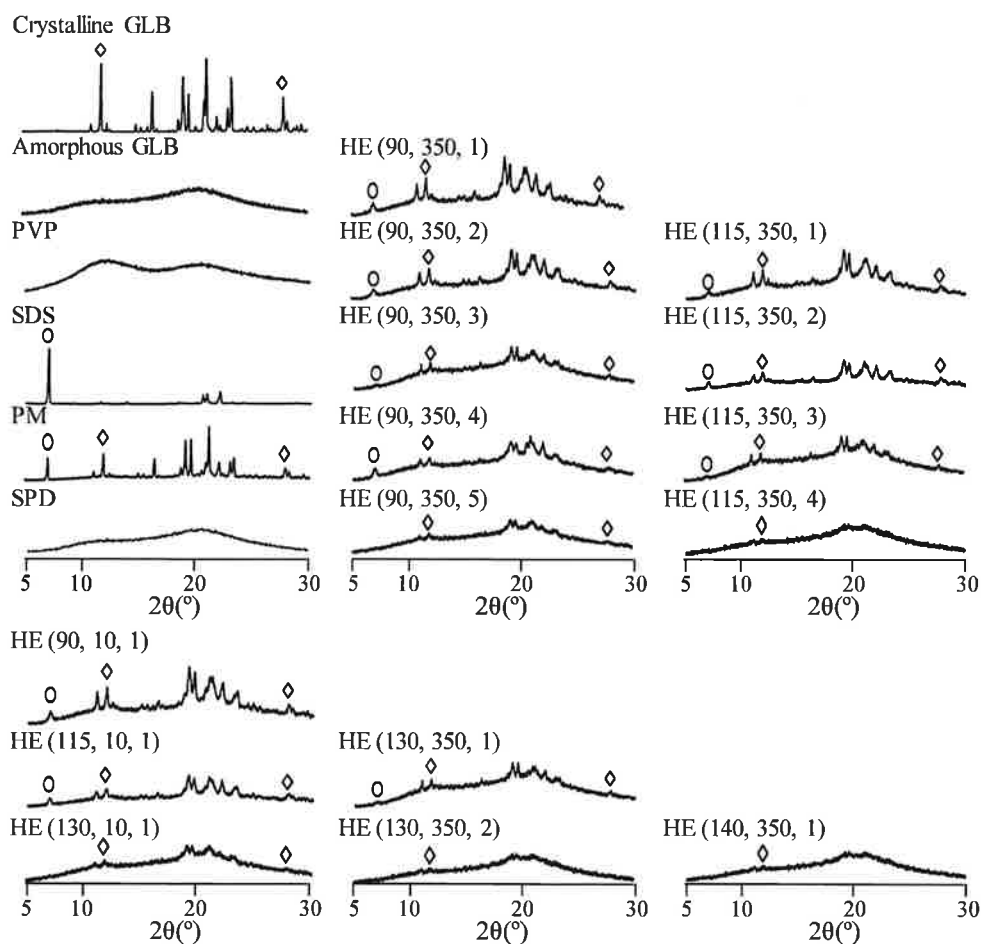


Figure 2. Powder X-ray diffraction (PXRD) patterns of GLB, GLB SPD, PVP, SDS, GLB/PVP/SDS PM, GLB/PVP/SDS SPD, and GLB/PVP/SDS HE. The characteristic peaks of GLB crystal (\diamond) and SDS crystal (\circ) were represented in figure.

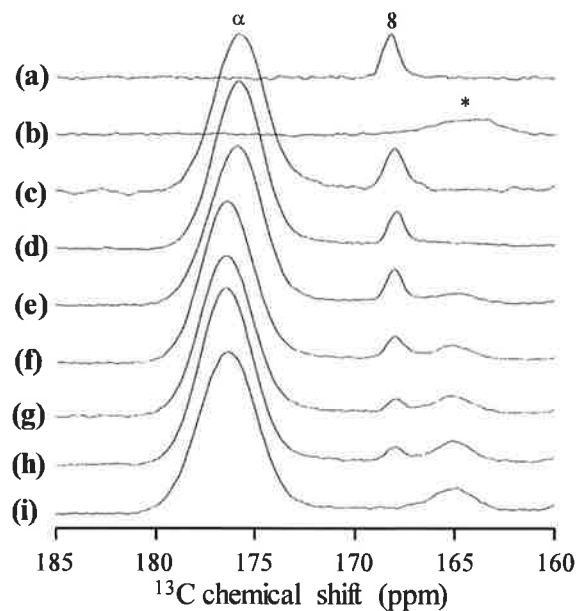


Figure 3. Enlarged view of solid state ^{13}C CP/MAS NMR spectra of (a) GLB, (b) GLB SPD, (c) PM, GLB/PVP/SDS (d) HE (90, 350, 1), (e) HE (90, 350, 2), (f) HE (90, 350, 3), (g) HE (90, 350, 4), (h) HE (90, 350, 5), and (i) GLB/PVP/SDS SPD. The characteristic peaks of amorphous GLB was indicted by asterisk.

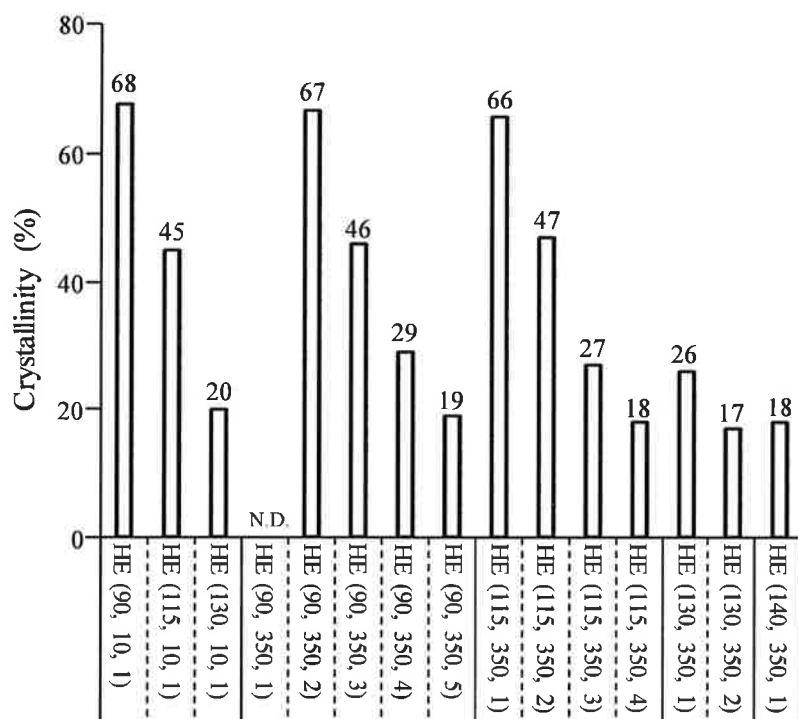


Figure 4. GLB crystallinity in GLB/PVP/SDS HE calculated by ^{13}C CP/MAS NMR measurements.

Table 1. Mean particle size of PM and HE suspensions before and after storage at 25°C. (n = 3, mean ± S.D.)

Sample	Particle size (nm)	
	Freshly prepared	After-4-hour stored
PM	Precipitate	Precipitate
HE (90, 10, 1)	198.8 ± 7.3	203.4 ± 4.8
HE (115, 10, 1)	178.7 ± 3.6	180.2 ± 8.4
HE (130, 10, 1)	418.7 ± 33.7	Precipitate
HE (90, 350, 1)	352.7 ± 20.6	484.4 ± 30.1
HE (90, 350, 2)	200.0 ± 10.7	203.6 ± 4.4
HE (90, 350, 3)	97.7 ± 4.3	104.1 ± 4.8
HE (90, 350, 4)	75.3 ± 4.7	80.1 ± 6.6
HE (90, 350, 5)	420.5 ± 30.3	Precipitate
HE (115, 350, 1)	291.7 ± 3.4	295.4 ± 4.2
HE (115, 350, 2)	168.1 ± 5.6	174.6 ± 3.3
HE (115, 350, 3)	79.9 ± 2.0	83.6 ± 2.4
HE (115, 350, 4)	401.8 ± 40.2	Precipitate
HE (130, 350, 1)	391.4 ± 43.8	438.1 ± 50.2
HE (130, 350, 2)	368.1 ± 45.6	Precipitate
HE (140, 350, 1)	376.4 ± 33.4	Precipitate

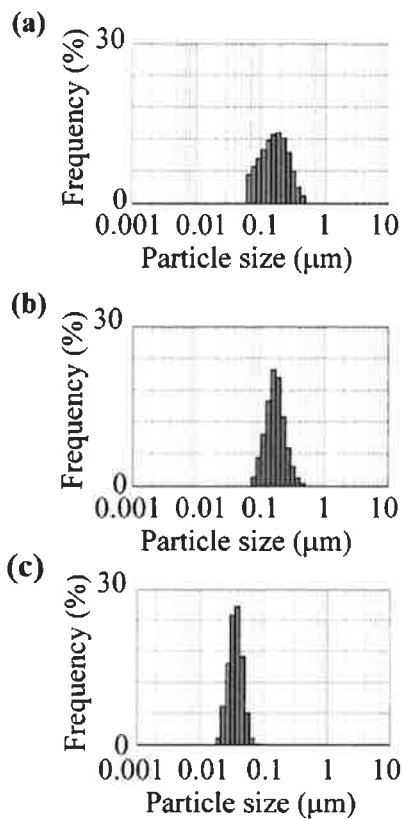


Figure 5. Particle size distribution of (a-c) GLB/PVP/SDS HE (90, 10, 1). Centrifugation was conducted at (b) 1,000 and (c) 21,500 $\times g$ for 30 min before particle size distribution measurements.

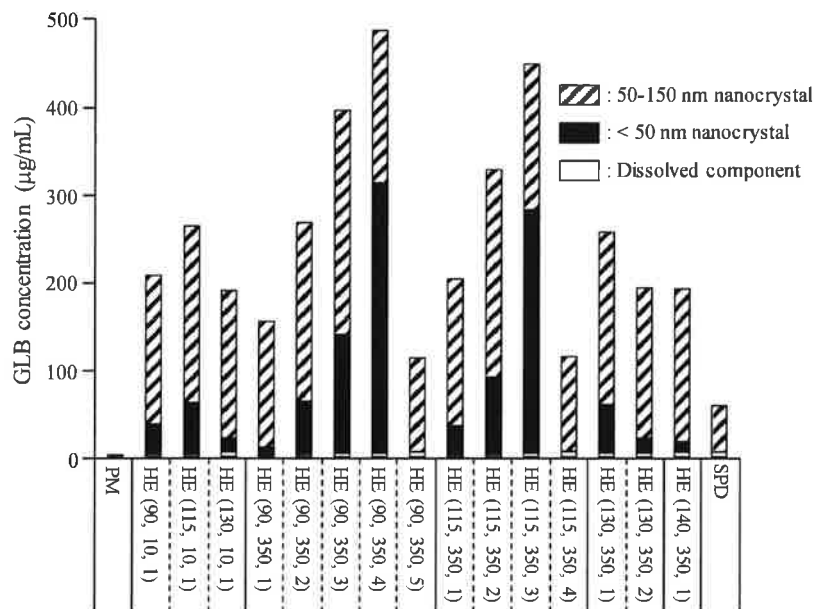


Figure 6. GLB concentration of GLB/PVP/SDS PM, HE, and SPD suspensions in each component.

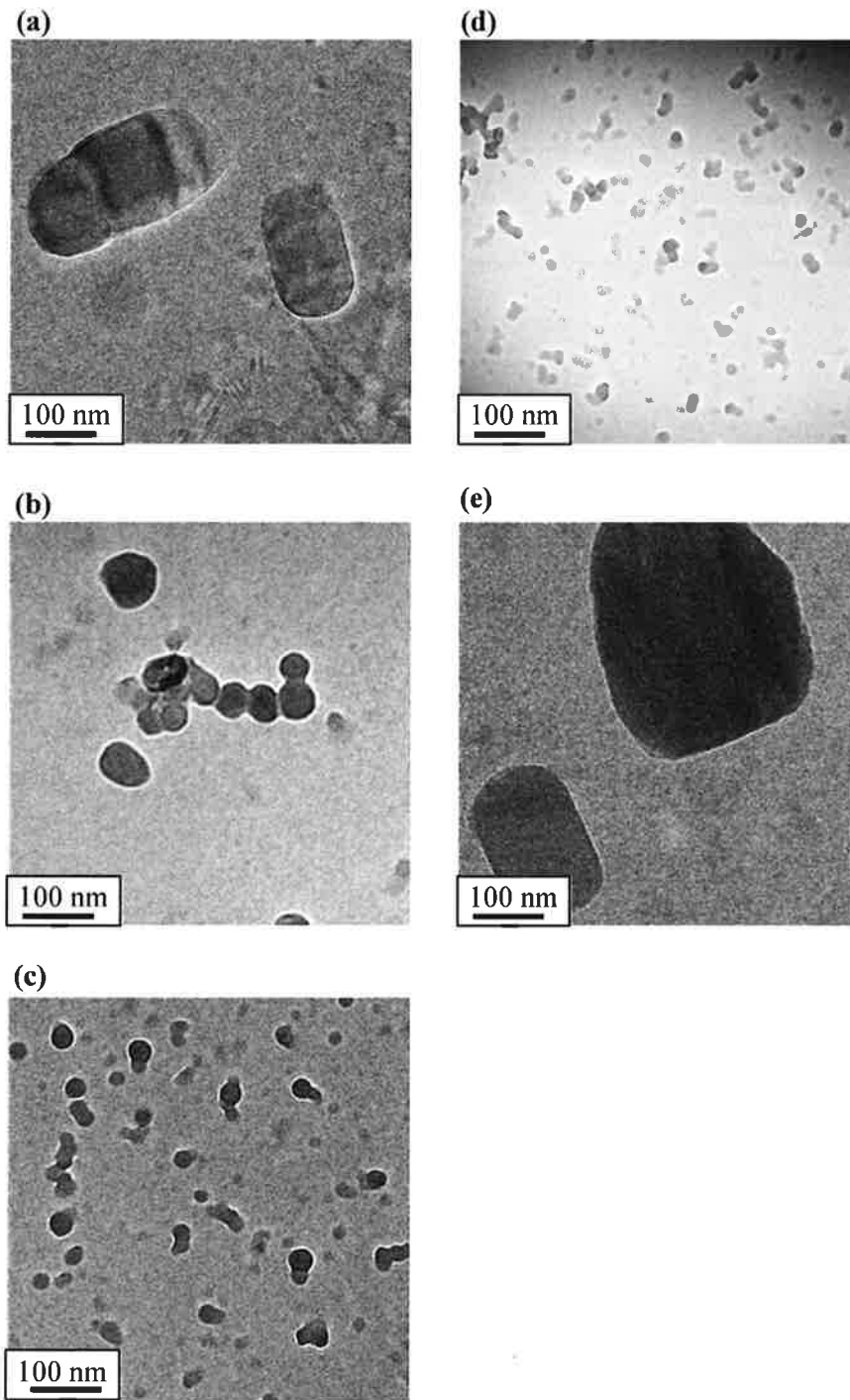


Figure 7. Cryogenic-transmission electron microscopy (Cryo-TEM) micrograph of (a-e) GLB/PVP/SDS HE (90, 350, 1-5) suspensions.

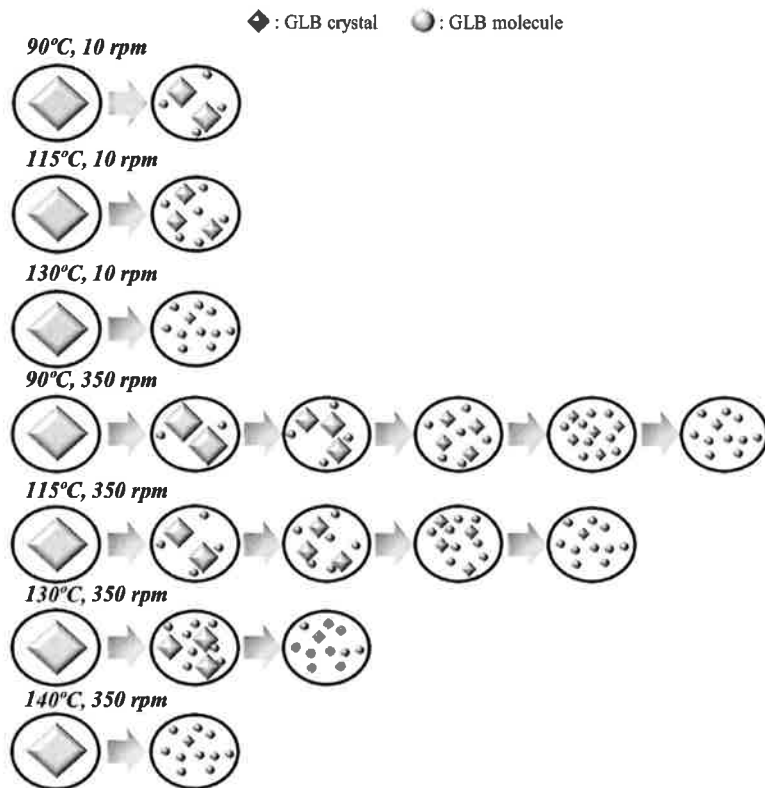


Figure 8. Schematic illustration of formation mechanism of drug nanocrystals prepared by hot extrusion at various conditions.