

(第9回) 2013年度・研究助成報告

研究題名	同軸二重ノズル噴射型超臨界 CO ₂ 貧溶媒によるサブマイクロ・カルテノイド粒子の調製
研究期間	2013年4月1日～2015年3月31日
研究機関・所属 研究者名	名古屋大学 大学院工学研究科 化学・生物工学専攻 神田 英輝

1. 2013(2014)年度研究成果の概要

抗酸化作用が強く、サプリメントとしても注目されている脂溶性植物色素のカロテノイドを対象にナノ粒子の製造を行った。カロテノイドは100 nm程度まで微細化することで吸収率が高まることが確認されている。本研究では超臨界二酸化炭素を貧溶媒として用い超臨界貧溶媒法によりカロテノイドのナノ粒子を調製した。医薬品への応用としてカロテノイドの一種であるリコピンとシクロデキストリンを複合化し、操作温度・圧力・二酸化炭素流量や溶液流量などの実験条件を最適化することで、約50 nmの球形ナノ粒子の作製に成功した。さらにβカロテンでは、食品添加物として認可されている酢酸エチルで処理することで、約140 nmの球形粒子を得ることができた。

2. 助成期間内での研究成果の概要

1. 緒言

緑黄色野菜に多く含まれる赤や橙色の鮮やかな色素はカロテノイドと呼ばれる脂溶性植物色素で、強い抗酸化作用など人体に対する多くの機能が注目され、野菜ジュースやサプリメントなどの形で広く利用されている。しかし、多くのカロテノイドは塊状でさらに脂溶性のため、水への溶解度が低く、油分とともに摂取しなければ吸収されにくい。これらの機能性成分が体内で効果を発揮するには、成分のサイズと親和性のコントロールが重要となる。例えば、カロテノイドの一種であるリコピンを100 nm程度に微細化することで、生体吸収率が向上することがラットの血液検査から明らかになっている。また、機能性成分の吸収率の向上を図る別の手法として、水溶性付加が挙げられる。これは目的物質の水への溶解度を促進することで、体液への吸収を狙っており、シクロデキストリン(CD)が添加物として注目されている。CDは環状オリゴ糖の一種で構造の内部が疎水性、外部が親水性のため、カロテノイドのような脂溶性物質を包接することで、水溶性を付加することができる。ナノ粒子の製造は、食品と医薬品の融合に有効であるものの、物理的粉砕では乾燥状態のカロテノイドナノ粒子の製造が困難である。このため、一般的にはカロテノイドは乳化物として取り扱われている。

現在、有効成分や医薬品の吸収率向上を狙い、超臨界 CO₂ を貧溶媒として用いる微粒子化法が注目されている。超臨界 CO₂ とは、温度と圧力が臨界点(31 °C、7.4 MPa)を超えた条件の CO₂ のことで、気体と液体の両方の性質を兼備している。気体のように低粘度・高拡散性のため、物質の隅々まで浸透することができ、それに加えて液体のように密度が高いことから、油脂や有機溶媒に対して溶解する能力が高い。そのため、目的物質が溶解している有機溶媒に、超臨界 CO₂ を接触させることにより、貧溶媒化を起こしてカロテノイドの析出を促進させることができる³⁾。超臨界貧溶媒法と呼ばれるこの手法は、操作条件により、超臨界 CO₂ の密度や溶解度を制御可能であるので、カロテノイド粒子のサイズも制御できる。さらに、有機溶媒の除去効率に優れ、CO₂ の残留もないので、高品質な生成物が得られると期待できる。そこで本研究では、カロテノイドのサイズと親和性の問題に対し、超臨界貧溶媒法およびβ-CDを用い、カロテノイドの一種であるリコピンおよびβ-カロテンのナノ粒子の作製を試みた。

2. 実験および考察

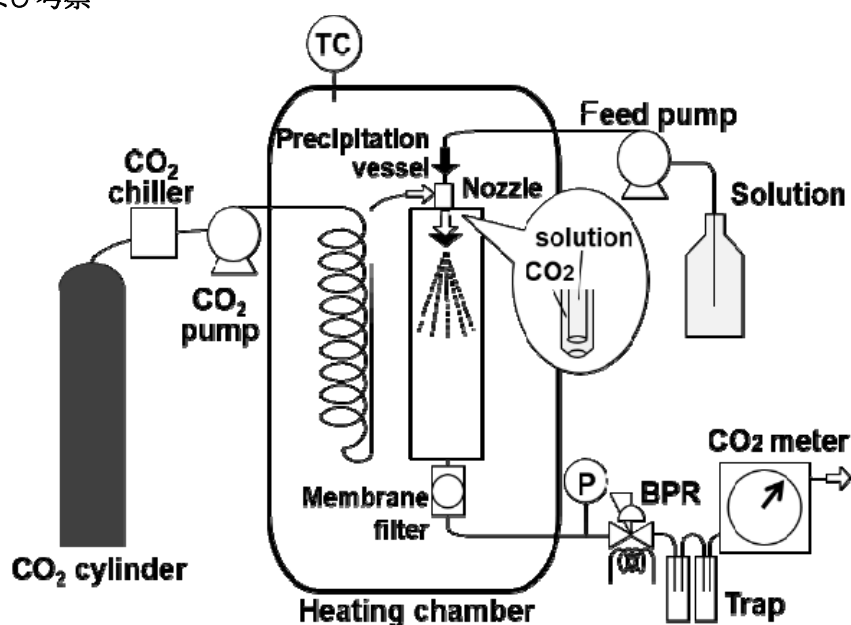


図1. 微粒子化装置概略図

微粒子化装置図を図1に示した。装置は CO₂ チラー、CO₂ 用ポンプ、恒温槽、溶液用ポンプ、ノズル、300 ml 微粒子化槽、粒子回収フィルター、背圧弁、ガスメーターで構築されている。また、噴霧部はカロテノイド溶液が超臨界 CO₂ と良好に混合して、微細な液滴となるよう、ノズル径 0.4 mm の同軸二重管ノズルを採用した。

まず、系内に超臨界 CO₂ を導入して所定の温度圧力に調整後、カロテノイド溶液を超臨界 CO₂ とともに、微粒子化槽へと噴霧した。微粒子化槽内で超臨界 CO₂ による貧溶媒化効果により、カロテノイド溶液から粒子が析出する。有機溶媒を含む超臨界 CO₂ は系外に排出され、生成されたカロテノイド粒子をメンブレンフィルターで回収した。

<実験1>水溶性カロテノイド包接体のナノ化

カロテノイドの生体への吸収能を向上させるため、ナノ粒子化および水溶性付加を狙い、添加物として β -CD を用いたナノ粒子化と、最適な温度・圧力・ CO_2 流量・溶液流量を検討した。カロテノイドとしてリコピン、 β -カロテンを、カロテノイドと β -CD を溶解する溶媒として *n,n*-ジメチルホルムアミド(DMF)を用い、モル比を 1:1 として溶液を調整した。操作は 40-50 °C、10-14 MPa、 CO_2 および溶液流量を 15-25、0.25-0.75 ml/min の範囲で行った。

結果として、操作温度 50 °C、圧力 14 MPa、 CO_2 および溶液流量をそれぞれ 25、0.25 ml/min に設定することで中位径 50 nm の粒子を得ることができ、ナノ化に成功した(図 2)。 β -カロテン/ β -CD 包接体の系でもリコピン同様、ナノ粒子を作製することに成功し、その中位径は 67 nm であった。

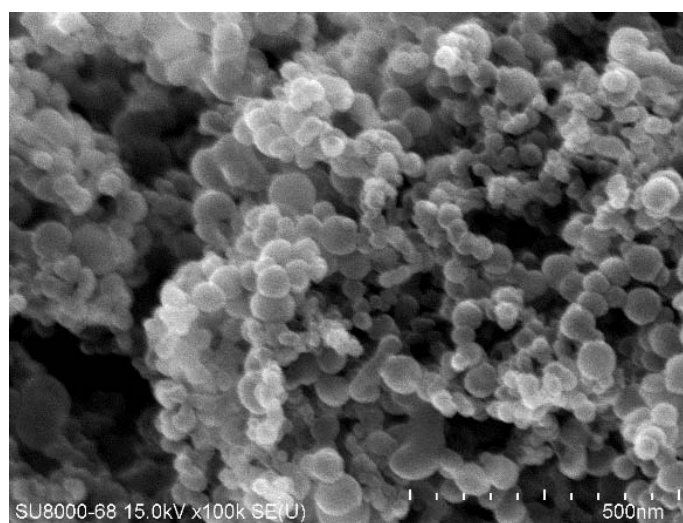


図 2. 本手法で得られた β -カロテン/ β -CD 包接粒子
(50 °C, 14 MPa, 25 ml/min_ CO_2 , 0.25 ml/min_ Soltion,)

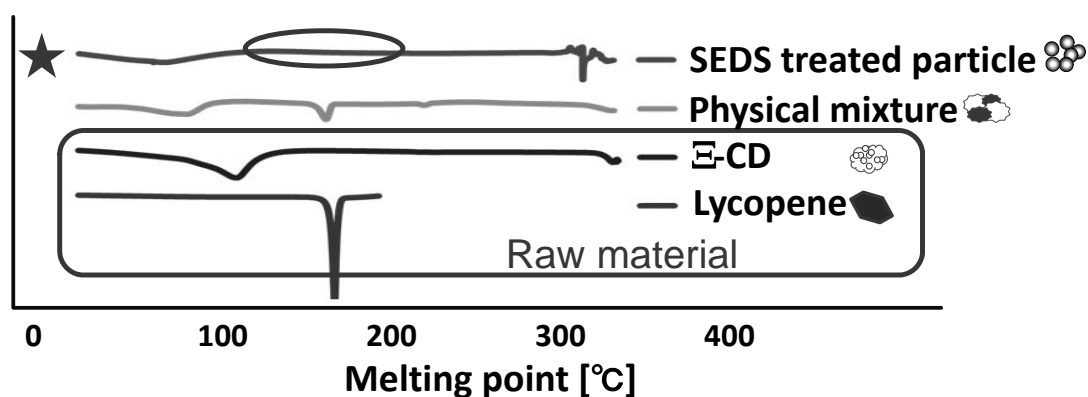


図 3. DSC 融点測定による β -カロテン粒子の β -CD 包接化の確認

<実験2>安全な有機溶媒の検討

実験1でカロテノイドのナノ化に成功したものの、その際に用いた有機溶媒 DMF が食品添加物として認可されていないため、食品加工に使用することができない。その問題を解決するため、食品添加物として認可されているヘキサンと酢酸エチルを代替に用いて検討した。β-カロテンを 0.5 mg/ml で溶解し、40 °C、12 MPa、CO₂ および溶液流量を 20、0.5 ml/min で実験を行い、適した溶媒を検討した。

実験の結果、ヘキサンではより大きなプレート粒子が得られ、酢酸エチルを用いた系のみで不定形ナノ粒子を得ることができた。得られた粒子の形状やサイズは溶媒の粘性や沸点、リコピンに対する溶解度、超臨界 CO₂ に対する溶解度の差により変化したと考えられる。

次に、ナノ粒子が得られた酢酸エチルを用いて、操作温度・圧力条件の最適化を行った。温度圧力依存性試験の条件範囲(40-60 °C、8-12 MPa)では低温および高圧条件で、中位径 138 nm の粒子が得られた。温度圧力によって粒子径が変化する要因として、超臨界 CO₂ の密度変化が親密に関与していると考えられる。密度が高い条件では、超臨界 CO₂ と有機溶媒の溶解度が高いことから、有機溶媒と超臨界 CO₂ が接触した際に、短時間で貧溶媒化が起き、超臨界 CO₂ によってカロテノイド粒子から有機溶媒が急速に除去されるため、粒子径が小さくなると考えられる。

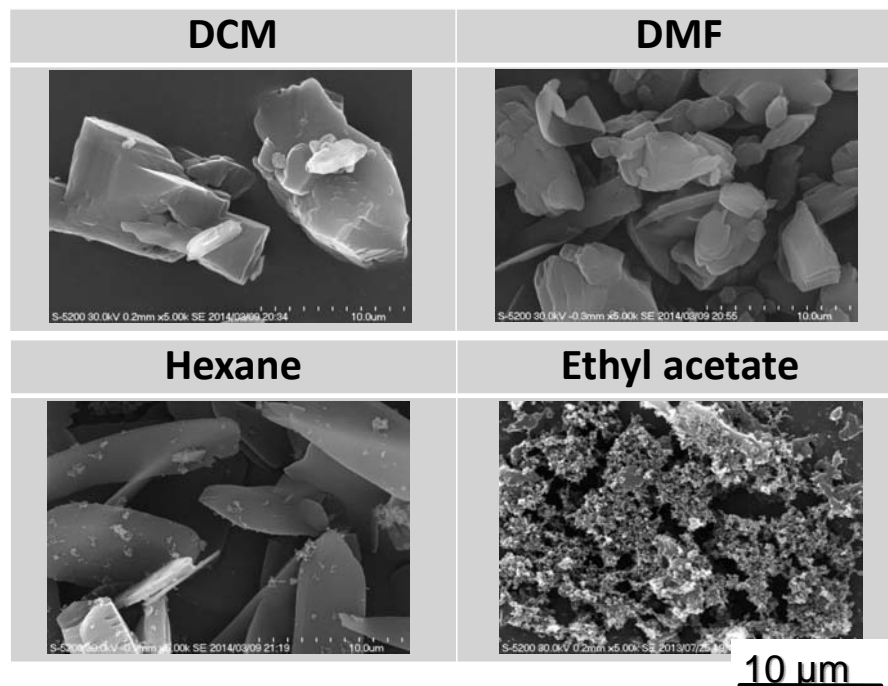


図4. 溶媒種によるカロテノイド粒子の形状変化

3. 結言

超臨界 CO₂ 貧溶媒法により、中位径 50nm のリコピン/ β -CD 包接粒子、中位径 67nm の β -カロテン/ β -CD 包接粒子を作製することに成功した。カロテノイドの希釈溶媒としてヘキサンを用いた場合にはプレート状のマイクロ粒子、酢酸エチルを用いた場合には不定形のナノ粒子を得ることができた。酢酸エチルを溶媒として用い、温度圧力の影響を検討した結果、40 °Cおよび 12 MPa の条件で、中位径 138 nm の粒子を得ることに成功した。最後に、研究助成を頂きました粉体工学情報センターに感謝の意を表します。

3. 研究発表

●査読付き論文

1. Hazuki Nerome, Siti Machmudah, Wahyudiono, Ryuichi Fukuzato, Takuma Higashiura, Hideki Kanda, Motonobu Goto, Micronization of fat-soluble functional pigment using supercritical carbon dioxide as anti-solvent, Proceedings of European meetings on Supercritical Fluids, LSH34 (2014)

●国際会議発表

1. Hazuki Nerome, Siti Machmudah, Wahyudiono, Ryuichi Fukuzato, Takuma Higashiura, Hideki Kanda, Motonobu Goto, "Micronization of fat-soluble functional pigment using supercritical carbon dioxide as anti-solvent", 14th European meeting on supercritical fluids, Marseilles, France, 2014/5/18
2. Hazuki Nerome, Siti Machmudah, Wahyudiono, R.Fukuzato, T. Higashiura, H. Kanda, M. Goto "Carotenoid Particle Formation Using Tube Type Supercritical Antisolvent Precipitator", International Symposium on EcoTopia Science 2013, Nagoya, Japan, 2013/12/13
3. Hazuki Nerome, Siti Machmudah, Wahyudiono, Ryuichi Fukuzato, Takuma Higashiura, Yong-Suk Youn, Youn-Woo Lee, Hideki Kanda, Motonobu Goto, "Nanonization of carotenoid/cyclodextrin complex using supercritical antisolvent", World congress of chemical engineering, Seoul, Korea, 2013/08/20

●国内会議発表

1. 根路銘葉月、Siti Machmudah、Wahyudiono、福里隆一、東浦拓磨、神田英輝、後藤元信
「同軸二重ノズルを用いた超臨界 CO₂ 貧溶媒法によるカロテノイド/シクロデキストリン包接粒子の調製」粉体工学会 春期研究発表会、京都、2014/5/29
2. 根路銘葉月、Siti Machmudah、Wahyudiono、福里隆一、東浦拓磨、神田英輝、後藤元信
「シクロデキストリンによるカロテノイドの包接と超臨界貧溶媒を用いたその微粒子化」日本化学工学会年会、岐阜、2014/03/20