

(第10回) 2014年度・研究助成報告

研究題名	新規高圧晶析装置を用いた難溶性食品成分のナノ結晶化および吸収性改善
研究期間	2014年4月1日～2015(2016)年3月31日
研究機関・所属 研究者名	岐阜薬科大学・製剤学研究室 小野寺理沙子

1. 2014(2015)年度研究成果の概要

<背景・目的>

近年、医療費削減や未病での予防養生の観点から、機能性健康食品に注目が集まっている。平成27年4月から新しく「機能性表示食品」制度が始まり、消費者は、これまで国が個別に許可していた特定保健用食品などだけでなく、さらに機能性を分かりやすく表示した機能性表示食品の選択肢が増えたことで、商品の正しい情報を得て取捨選択ができるようになった。しかし、機能性健康食品中に含有される有効成分の多くは、難水溶性を示すことが広く知られており、代表的なポリフェノール類においてもフラボノイドやクルクミンなどが難水溶性化合物である。一般に薬物を経口投与した場合、消化管内において、分散・溶解・膜透過の各過程を経て消化管上皮細胞より吸収され、門脈から肝臓を通り全身循環に至る。しかし、難水溶性化合物は、消化管内において溶解が不十分なことが原因で生物学的利用能(バイオアベイラビリティ)が低下し、血中濃度のバラツキが大きくなる。さらに、吸収量の頭打ちにより、投与量と体内動態パラメーターに比例関係のない非線形性の出現、あるいは食事などの変動条件により吸収バラツキが拡大するなどのリスクが生じやすい。

難水溶性化合物の溶解性改善の代表的な手法として、①薬物結晶の微細化、②担体を用いた固体分散体などの複合体の調製、③自己乳化型製剤、シクロデキストリン、高分子ミセルなどの液状化製剤化技術などがある。中でも、薬物結晶の微細化は、粒子の粉碎や凝集体の解砕によりサイズダウンさせるトップダウン法と薬物溶液から晶析やコアセルベーションなどによりナノサイズの粒子を生成させるボトムアップ法に大別することが出来る。トップダウン法は、汎用されており生産性に優れているが、微細化できる粒子径のサイズに限界があり、結晶性の制御が困難である。一方で、ボトムアップ法は、エネルギー効率が良好で、低コストであり、また得られる粒子の粒度分布は非常に狭いことがメリットであるとされている。

そこで本研究では、ボトムアップ法の一つである晶析法に高圧ホモジナイザー機構を適用した高圧晶析装置(PureNano[®], Fig. 1)を用いて、難水溶性健康食品成分の微細化および吸収性の改善を目指し、晶析条件の最適化、分散安定化剤および粉末製剤化検討ならびに吸収性評価を行った。

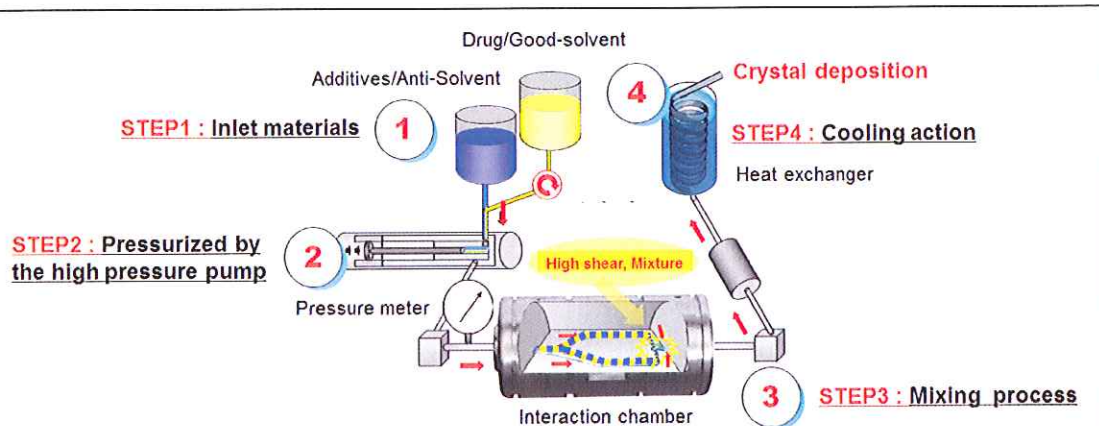


Fig.1 高圧晶析装置 (PureNano[®]) の模式図

Purenano[®] による難水溶性の微細化は、① 難水溶性薬物および分散剤をそれぞれ良溶媒相、貧溶媒相にそれぞれ投入、② プランジャーポンプにより最大 138MPa にて原液を加圧、③ チャンバー内で精密混合処理、④ 熱交換器にて試料を冷却の 4 ステップを経る。PureNano[®] を用いた場合、反応容器内部では、高強度のせん断場が形成され、乱流による強エネルギー拡散メカニズムが活性化されることから、得られる固形物の多くはサブミクロンサイズに収まり、通常の攪拌機による混合走査、もしくは分散操作では得られないサイズのものが得られる。また、1 回の操作により調製が完了するため、省エネルギーかつ低コストな調製法であることが利点として挙げられる。

<実験方法>

1. 試料

難水溶性健康食品有効成分としてクルクミン (東京化成)、分散安定剤として環状マルトオリゴ糖である β -シクロデキストリン (β -CyD 日本食品化工(株)) または ヒプロメロース (HPMC)、凍結時の保護剤としてトレハロース (和光純薬工業) を用いた。

2. クルクミンの溶解度に及ぼすシクロデキストリン添加の影響

β -CyD の濃度が 1, 5, 10, 20 mg/mL になるように蒸留水 25 mL 中に溶解させた。クルクミン原末 25 mg を各濃度の CyD 溶液に溶解後、37°C、100 rpm で 24 時間振とうした。その後、1 mL を分取し、0.2 μ m の PTFE フィルター濾過し、ろ液をエタノールに完全溶解後、HPLC にて溶解度を定量した。HPLC の条件を以下に示す。

Table 1 Condition of HPLC

Detector	UV
Wavelength	254 nm
Column	Φ 4.6*150 mm 5 CN-MS
Column temperature	35 °C
Injection volume	20 μ L
Retention time	4.57 min
Mobile phase	Acetonitrile/Citrate buffer (pH=3.0) =1/1
Flow rate	1.0 mL/min

2. 高圧晶析装置を用いたナノ粒子の調製

2-1. 分散安定剤としてのシクロデキストリンの利用

良溶媒相としてクルクミン 100 mg をエタノール 40 mL、貧溶媒相として β -CyD 500 mg を蒸留水 400 mL 中に溶解した。その後、Purenano[®] を用いて晶析させ懸濁液を調製した。さらに、晶析回数が調製粒子に与える影響を検討するため、処理回数を 2 回、5 回、10 回と変化させた。

2-2. 分散安定剤としてのヒプロメロースの利用

分散安定剤として HPMC を用いて粒子調製を行った。2-1. と同様に各種溶液を調製し、Purenano[®] を用いて晶析させ懸濁液を調製した。なお、処理回数は 1 回とした。

2-3. 凍結乾燥時の添加剤としてのシクロデキストリンの利用

2-2. の方法より調製したクルクミンナノ粒子懸濁液をエバポレーションを用いてエタノールを除去した。次に、凍結乾燥時の添加剤として β -CyD またはトレハロースを添加し、凍結乾燥法により粉末製剤化した。

4. 各種調製粒子の物理化学的評価

調製した懸濁液及び凍結乾燥粒子の粒子径は、Zeta Sizer Nano ZS (MALVERN INSTRUMENT) を用いて測定した。クルクミンの結晶性は、粉末 X 線回折装置 (D8, ADVANCED, Bruker AXS) を用いて、 $2\theta=2^\circ/\text{min}$, $5-30^\circ$ の範囲で測定した。

5. ナノ粒子の溶出試験評価

調製したナノ粒子の溶出挙動は、日局 16 パドル法に準じて、高温水槽式溶出試験器 (Dissolution Tester NTR-6100、富山産業) を用いて評価した。濡れ性を向上させるため、0.1% Tween 80 を添加し、 37°C 、100 rpm の条件下、経時的にサンプリングを行い、薬物量を HPLC を用いて定量した。

<結果>

クルクミンの溶解度に及ぼすシクロデキストリン添加の影響

β -CyD 添加によるクルクミンの溶解度変化を測定したところ、 β -CyD の添加濃度依存的にクルクミンの溶解度は向上した。なお、クルクミン原末の溶解度は、11 ng/mL である。一般に、クルクミンと β -CyD は、包接複合体を形成することが知られていることから、本実験条件下においても包接複合体の形成により、溶解度が向上したものと考えられる。また、Fig.2 に示した溶解度相図からも分かるように、クルクミンの溶解度は CyD 添加により、直線的に向上していることから、 β -CyD とクルクミンは 1:1 の複合体を形成しているものと示唆された。

高圧晶析装置を用いたナノ粒子の調製

先の検討により、 β -CyD はクルクミンの溶解度を向上させることが明らかとなったことから、まず、晶析時の分散安定剤として利用を企図し、検討を行った。その結果、調製直後はナノオーダーの粒子が調製可能であったが、調製 3 時間後において、粒子の凝集が観察された。さらに、晶析回数を 1 ~ 10 回まで変化させたが、晶析回数の増加による粒子の凝集抑制は確認できなかった。よって、晶析時の分散安定剤としての β -CyD の利用は難しいことが明らかとなった。

そこで次に、分散安定剤として汎用されているヒプロメロース (HPMC) を用いて同様の検討を行った。その結果、クルクミンと HPMC が 1:1 の処方において、100 nm 以下の粒子が調製可能であり、調製 3 時間後においても調製直後とほぼ同等の粒子径を維持することが明らかとなった。このことから、晶析時の分散安定剤として HPMC を用いることで、クルクミンナノ粒子の調製が可能であることが明らかとなった。

次に、粉末製剤化を目的とし、凍結乾燥法を用いてナノ粒子の粉末製剤化を検討した。凍結乾燥の直前のクルクミン懸濁液に凍結保護剤としての機能に加え、再分散性の向上および溶解度の向上を期待し、 β -CyD を添加した。なお、比較として凍結保護剤として一般に用いられているトレハロースを用いて、同様の検討を行った。なお、粒子の再分散性は、調製した乾燥粉末粒子を蒸留水に再分散させた後、粒子径を測定することで評価した。 β -CyD またはトレハロースを凍結乾燥時の保護剤として、クルクミン : HPMC = 1:1 に対して 0.1、1、10 と添加量を変化させた結果、 β -CyD では、10 以上で再分散後もサブミクロンサイズの粒子径を示し、再分散性に優れる粒子が調製可能であることが明らかとなった。一方、トレハロースを用いた場合においては、添加量を 10 以上とした場合においても粒子の凝集が観察された。このことから、 β -CyD は、晶析時の分散安定剤としてではなく、凍結乾燥時の添加剤として有用であることが示唆された。

各種調製粒子の粉末 X 線回折測定

先述の処方を用いて調製した各種ナノ粒子の結晶性を確認するため、粉末 X 線回折測定を行った。その結果、高圧晶析処理による結晶形の変化は認められなかった。一方、クルクミン由来のピークの減少が確認され、晶析処理による微細化に加え、非晶質化による結晶性の減少が示唆された。

ナノ粒子の溶出試験評価

調製したナノ粒子の溶出挙動の評価を行った。先に検討により、 β -CyD とクルクミンは包接複合体を形成することが明らかとなっている。そのため、 β -CyD を用いて調製したナノ粒子においては、晶析処理による微細化に加えて、クルクミンが試験液中で β -CyD と包接複合体を形成することで溶解度が向上することが考えられる。そこで、蒸留水における経時的な溶解度の測定を行った。その結果、クルクミンと HPMC の物理的混合品では、試験開始 30 分後において、約 10% 程度の溶出率を示した。これは、分散安定剤として用いた HPMC によるクルクミンの試験液に対する濡れ性が改善されたためであると考えられる。一方、凍結乾燥品に関しては、大幅な溶出速度の改善が認められ、試験開始 2 分で約 60% の溶出を示すことが明らかとなった。これらは、高圧晶析装置を用いることでクルクミンがナノレベルまで微細化され、凍結乾燥粒子に関しても再分散性が良好であったために、原末と比較し試験液に対する表面積が向上したことに由来すると推察された。

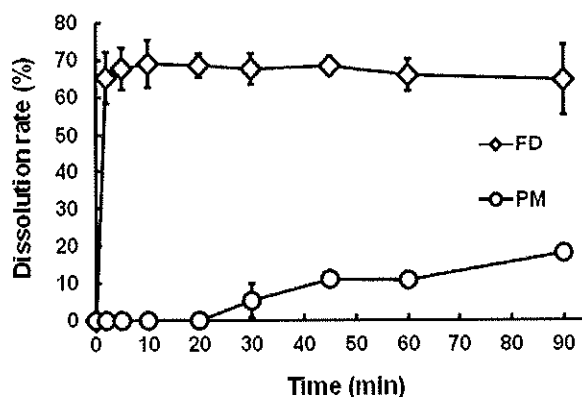


Fig.2 クルクミンの溶出挙動
○:凍結乾燥品 (FD), ◇:物理化学的混合物 (PM),
FD and PM; Curcumin/HPMC/ β -CyD = 1/1/10.

2. 研究発表

なし。