

（第11回）2015年度・研究助成報告

研究題名	食品添加剤を粉砕助剤としたメカノケミカル技術による難水溶性食品成分の溶解性改善
研究期間	2015年4月1日～2016(2017)年3月31日
研究機関・所属 研究者名	大阪薬科大学 薬学部 製剤設計学研究室 門田 和紀

1. 2015（2016）年度研究成果の概要

本研究では、機能性食品添加剤である糖転移させた添加物（糖転移ルチン、糖転移ヘスペリジン、糖転移ナリンジン）を粉砕助剤とし、難溶性を示すいくつかの健康食品の有効成分との間で生じるメカノケミカル反応を利用し、ナノ粒子化・非晶質化・複合体粒子を作製することによる溶解度改善を試みた。本研究では、モデル化合物として、葉酸を使用した。葉酸の溶解性はpHに依存し、弱酸性化合物であるため、低pH領域における溶解性の低下が問題となる。これら問題点を改善するため、酵素処理技術により糖を転移させた糖転移化合物である糖転移ヘスペリジン、糖転移ナリンジンに着目し、湿式ビーズミルによる粉砕を行った。その結果、糖転移化合物を使用し湿式ビーズミル粉砕を行うことにより100 nm以下の葉酸ナノ粒子作製に成功した。この葉酸ナノ粒子は粉砕後、凍結乾燥処理を行った製剤を再分散した溶液においても、高い分散性を示し100 nm以下の粒子径を維持した。調製した葉酸ナノ粒子は、胃内環境下における溶出試験において、原末と比較して速い溶出性を示し、さらに糖転移化合物が有する抗酸化作用により葉酸の光分解の抑制が可能であった。

2. 助成期間内での研究成果の概要

1. はじめに

葉酸は生体機能を正常に保つために欠かせない化合物である。妊娠初期における葉酸摂取が胎児の神経管閉鎖障害の発生を低減化すると報告されており、特に妊婦に対し栄養補助食品による葉酸摂取が推奨されている。しかし、葉酸の溶解性はpHに依存し、弱酸性化合物であるため、低pH領域における溶解性の低下が問題となる。そのため、胃内での溶解性を維持し、吸収性を上昇させることが困難である。さらに、葉酸は酸素共存下において光により容易にラジカル分解することが知られている。これら問題点を改善するため、酵素処理技術により糖を転移させた糖転移化合物である糖転移ヘスペリジン、糖転移ナリンジンに着目した。糖転移化合物は、難溶性化合物の溶解性を改善し、抗酸化作用を有することが知られている。本研究では、糖転移ヘスペリジン、糖転移ナリンジンを粉砕助剤として使用し、湿式ビーズミル粉砕による葉酸の微粒化を行うことで葉酸の溶解性及び光安定性改善を目指した。

2. 実験方法

2.1 使用化合物

葉酸 (Folic acid; FA)は 6-methylpterin、p-aminobenzoic acid、glutamic acid の 3 つの構造式から成る化合物である。添加剤として糖転移ヘスペリジン (α -glucosyl hesperidin: Hsp-G)、糖転移ナリンジン (α -glucosyl naringin: Nrg-G)及び粉碎助剤として汎用されている Poly vinylpyrrolidone (PVP) Kollidon K30 を使用した。Fig. 1 に葉酸、糖転移ヘスペリジン及び糖転移ナリンジンの化学構造を示す。

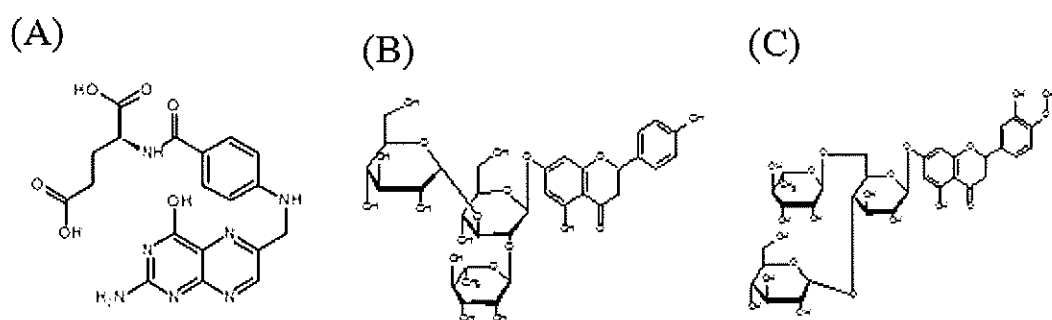


Fig. 1 Chemical structures of (A) Folic Acid, (B) Naringin-G and (C) Hesperidin-G.

2.2 湿式ビーズミルによる葉酸微粒子の作製

Fig. 2 に湿式ビーズミル粉碎機として使用した Ultra Apex Mill (Hiroshima metal & machinery Co.)の概略を示す。原料スラリーは精製水 500 mL 中に FA 1 mg/mL に対して Hsp-G、Nrg-G 及び PVP-K30 を 10 mg/mL 加えて調製した。運転条件はジルコニアビーズ (0.1 mm 径)を充てん率が約 63%になるように投入し、ローターピン周速を 8 m/s、スラリー供給速度を 150 mL/min とし、300 分間粉碎を行った。粉碎後の懸濁液は-40℃で凍結後、30 Pa 以下で1日凍結乾燥処理し、粉末化した。FA と各添加剤の物理的混合物は湿式ビーズミルに使用した試料と同じ比率で調製した。

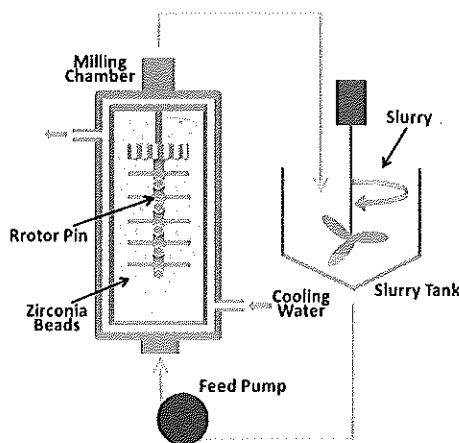


Fig. 2 Schematic of the beads milling process.

2.3 葉酸粒子の物性評価

2.3.1 粒子径評価

FA の粒子径分布は動的光散乱法 (Nanotracs UPA-UT151, Nikkiso Co.)を使用して測定を行った。湿式ビーズミル粉碎中の FA 粒子径経時変化を評価するため懸濁液を採取し、粒子径を測定した。さらに粉碎後、室温下で1日保存した懸濁液、および凍結乾燥処理を行った製剤を精製水中に FA 1 mg/mL で再分散させた溶液の粒子径評価も行った。

2.3.2 結晶性評価

結晶構造について、粉末 X 線回折 (Miniflex, Rigaku Co.)を用いて評価した。X 線は 15 mA、40 kV で Cu K α 線を発生させ、5-35°に現れる回折線を 0.02°/min のステップ幅と 4°/min の走査速度で検出した。

2.3.3 作製した葉酸粒子の溶出性評価

胃内環境下における FA の経時的な溶出性を評価するため、凍結乾燥製剤及び物理的混合物の溶出試験を実施した。溶出試験は JP16 (パドル法)に基づき、37 \pm 0.5 °C の条件下で各製剤を FA 量として 5 mg 測り取り、溶出試験第一液 900 mL (JP 1st: pH1.2)に分散させた。所定時間に採取したサンプルは 0.2 μ m フィルターにて濾過した後、HPLC (Alliance: e2695,2489, Waters, Milford, United States)により FA 濃度を測定した。HPLC 条件は以下に示す。(Column temperature, 40 °C; Injection volume, 10 μ L; Flow rate, 1.0 mL/min; Mobile phase, 0.1% acetic acid (A) methanol (B) 0–5 min, 80% A; 5–10 min, 80–50% A; 10–12 min 50% A; and 12–15 min, 50–80% A)

2.3.4 葉酸の光安定性評価

FA 100 μ g/mL となるように FA 原末および凍結乾燥製剤を水に分散させ作製した試料溶液を含むガラスバイアルを蛍光灯下 (500 lx)で 3 日間保存した。対照として、同様に作製した試料溶液を遮光下で 3 日間保存した。保存後の各試料における FA 含有量を HPLC にて測定し、光に曝露した試料溶液と遮光した試料溶液の FA 含有量の差を用いて光安定性を評価した。HPLC の条件は 3.3 に記載した条件を使用した。

3. 結果および考察

3.1 湿式ビーズミル粉碎中の葉酸メジアン粒子径の経時変化

Fig. 3 に湿式粉碎中の FA メジアン粒子径の経時変化を示す。FA 単体で粉碎した結果、粉碎時間 100 分まで粒子径が減少した後、粒子径の増大が認められた。これは粉碎による表面積増加により、粒子表面のエネルギーが増大したため FA 粒子が凝集したと考えられる。また PVP を使用した湿式粉碎においても 100 nm 付近まで粒子径減少後、粉碎時間の経過とともに FA 粒子径が増大した。一方 Hsp-G、Nrg-G を粉碎助剤として使用した結果、100 nm 以下の粒子が調製可能であり、粒子径は 300 分後において Hsp-G において 69.9 nm、Nrg-G において 49.7 nm であった。また、300 分粉碎後の懸濁液を 1 日室温下で保存した溶液及び凍結乾燥製剤を再分散させた水溶液の粒子径を Table 1 に示す。

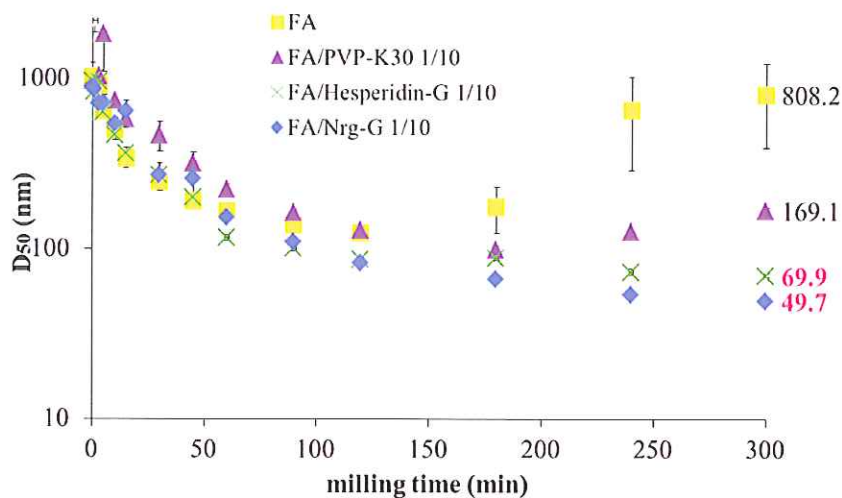


Fig. 3 The effect of the beads milling time on the mean particle diameter.

Hsp-G、Nrg-G を添加した懸濁液を室温下で 1 日保存した溶液において FA ナノ粒子が凝集することなく、粒子径を維持していた。さらに凍結乾燥製剤を再分散させた水溶液において、FA 単体及び PVP を添加した条件では、粒子の著しい凝集が認められたのに対し、Hsp-G、Nrg-G を添加した条件では凝集を認めず、ナノ粒子の再分散性に優れていた。

Table 1 Mean particle diameter of milled slurry after 24 h storage and resuspended freeze-dried powders.

Samples	Untreated (nm)	Milled slurry		Re-suspended freeze-dried powders (nm)
		Initial (nm)	After 24 h storage (nm)	
Untreated FA	1290 ± 126.7	—	—	—
Beads milled FA	—	808.2 ± 416.5	782.9 ± 307.7	2734.1 ± 1255.2
FA/PVP-K30 1/10	—	169.0 ± 6.0	233.8 ± 5.5	2920.5 ± 695.3
FA/Hsp-G 1/10	—	69.9 ± 1.6	71.7 ± 2.5	81.0 ± 3.8
FA/Nrg-G 1/10	—	49.7 ± 1.8	42.7 ± 1.3	58.9 ± 1.1

3.2 凍結乾燥製剤の結晶性評価

各製剤の粉末 X 線回折による回折パターンを Fig. 4 に示す。物理的混合物において、FA 由来の結晶ピークが観察されるのに対し、湿式粉碎後凍結乾燥処理を行ったいずれの製剤においても結晶性ピークの低下が認められた。これは粉碎エネルギーによる非晶質化促進、あるいはナノ粒子化により粉末 X 線回折によって結晶性が検出できなかったと示唆される。

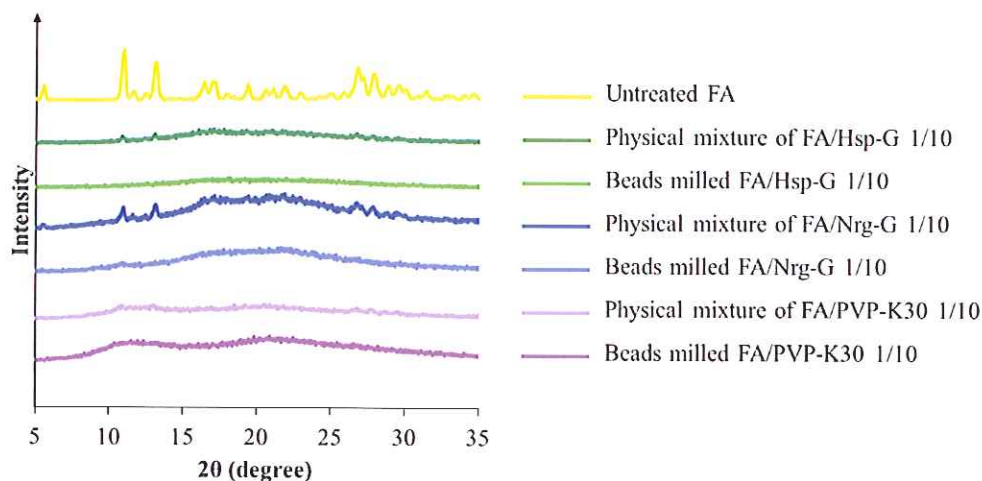


Fig. 4 Powder X-ray diffraction patterns of Freeze-dried samples and physical mixtures.

3.3 胃内環境における葉酸の溶出性評価

Fig. 5 に溶出試験第 1 液に対する FA の溶出性について評価した結果を示す。湿式粉碎を行ったいずれの製剤においても物理的混合物と比較して、溶出性の改善が認められた。特に Nrg-G を使用した製剤において、溶出試験開始約 30 分で仕込み量が全量溶解し、著しい溶出性の改善が確認された。これは、Noyes-Whitney 式で表されるように粉碎による粒子径減少により、粒子の比表面積が増大したため、ナノ粒子表面から葉酸の溶出速度が大幅に改善されたと考えられる。

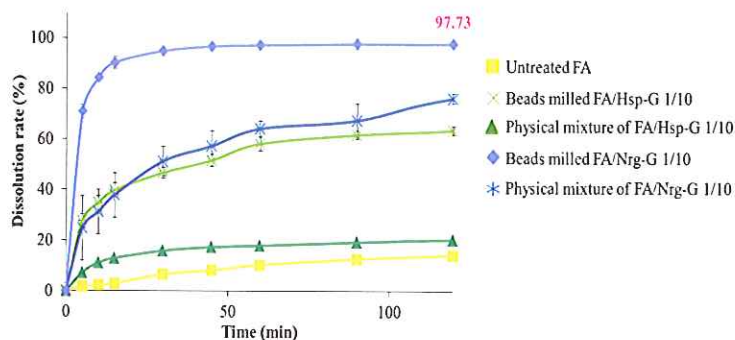


Fig. 5 Dissolution profile of freeze-dried samples and physical mixtures in JP 1st fluid.

3.4 葉酸の室内環境下における光安定性試験

FA 原末及び凍結乾燥製剤を分散した溶液を室内環境下で保存した光安定性試験の結果を Fig. 6 に示す。FA 原末は光照射 2 日目には FA 残存率が 20%以下まで低下し、3 日目には完全に分解していたのに対し、糖転移化合物を添加した条件では光照射 3 日目においても約 80%の FA 残存率が示された。光分解抑制のメカニズムは、Hsp-G、Nrg-G が有する抗酸化作用により液中でラジカルを捕捉し、FA のラジカル分解を抑制したと考えられた。

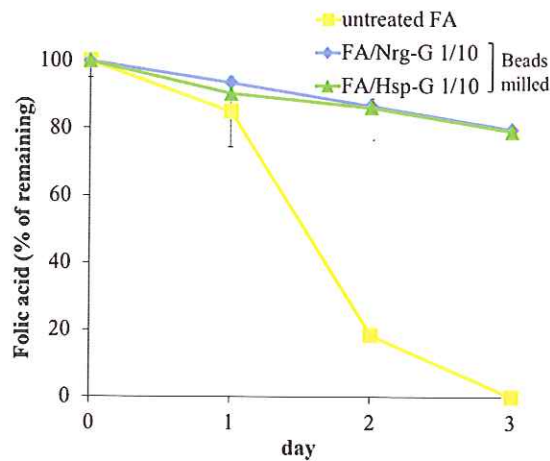


Fig. 6 Photostability of FA solutions with transglycosylated compounds.

4. まとめ

本研究において、機能性食品添加剤である糖転移ヘスペリジンおよび糖転移ナリンジンを粉砕助剤とし、健康食品の有効成分である葉酸について 100nm 以下のナノ粒子作製を実現した。さらに、一般的に粉砕助剤や分散媒として使用されている高分子に比べても、再分散性が高く粉砕助剤あるいは分散媒体として、糖転移化合物は有効であると考えられる。また、葉酸は低 pH 条件下では溶解性が非常に低いとされていたが、糖転移により微粒化した葉酸ナノ粒子は胃内 pH である 1.2 においても溶解度原末に比べて高く、溶解性が改善された。また、糖転移化合物の抗酸化作用を利用して、光に不安定である葉酸についても光安定性を改善することが可能となった。

この糖転移化合物については湿式粉砕における分散剤として有効であり、さらに光安定性も改善することが確認でき、今後健康食品として利用される他の有効成分についても同様の効果が期待できるものと考えられる。

最後に、本研究助成に対しまして、粉体工学情報センターの関係者各位に深く御礼申し上げます。

3. 研究発表

【論文発表】

1. **Kazunori Kadota**, Kumi Semba, Ryosuke Shakudo, Hideyuki Sato, Yuto Deki, Yoshiyuki Shirakawa, Yuichi Tozuka, Inhibited photodegradation of highly-dispersed folic acid nanoparticles by functional food additive, Journal of Agricultural Food Chemistry, 64 (2016) 3062-3069.
2. Yuto Konishi, **Kazunori Kadota**, Yuichi Tozuka, Atsuko Shimosaka, Yoshiyuki Shirakawa, Amorphization and radical formation of cystine particles by a mechanochemical process analyzed using DEM simulation, Powder Technology, 301 (2016) 220-227.

【学会発表】

1. **Kazunori Kadota**, Kumi Semba, Ryosuke Shakudo, Hideyuki Sato, Yuichi Tozuka, Folic acid nanoparticle production with highly dispersion and photostability using α -glycosyl rutin, 3rd International Conference on Food Structures, Digestion and Health, 2015/10 Wellington (New Zealand)
2. 仙波久実, 赤土了介, 藤森美季, **門田和紀**, 戸塚裕一, 酵素処理ルチンによる光安定性改善を指向した葉酸ナノ粒子の作製. 日本薬剤学会第40回製剤セミナー, 2015年8月, 淡路夢舞台(兵庫)
3. **門田和紀**, 仙波久実, 戸塚裕一: 機能性食品添加剤を粉碎媒体として利用した湿式ビーズミルによる葉酸ナノ粒子作製, 化学工学会第81年会, 2016年3月, 関西大学 吹田キャンパス(大阪)
4. 仙波久実, **門田和紀**, 戸塚裕一, 湿式ビーズミル粉碎による葉酸ナノ粒子調製への糖転移ナリンジンの有用性, 日本薬剤学会第31年会, 2016年5月, 長良川国際会議場(岐阜)
5. **Kazunori Kadota**, Takahito Deguchi, Kumi Semba, Miki Fujimori, Hideaki Tagishi, Yuichi Tozuka, Composite formation of quercetin and biodegradable food materials for inhalation formulations, 3rd International Conference on Bio-based Polymers and Composites, 2016/8, Szeged(Hungary)
6. 出口貴一, **門田和紀**, 戸塚裕一: ケルセチンの経肺吸入特性に及ぼす1次粒子径の影響, 第66回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2016年10月, 大阪薬科大学(大阪)
7. 仙波久実, **門田和紀**, 戸塚裕一: 湿式ビーズミルにより作製した葉酸ナノ粒子の溶解性及び光安定性改善, 製剤機械技術学会第26回大会, 2016年10月, 千里ライフサイエンスセンター(大阪)