

## (第15回) 2019年度・研究助成報告

研究題名	噴霧乾燥条件が機能性食品成分間での非晶質複合体形成に及ぼす影響
研究期間	2019年4月1日～2021年3月31日
研究機関・所属 研究者名	大阪薬科大学・製剤設計学研究室 内山 博雅

## 1. 2019 (2020) 年度研究成果の概要

本研究では、フラボノイド化合物であるナリンゲニンとヘスペレチンとの間で形成される非晶質複合体形成について、噴霧乾燥条件が安定性や溶解性に及ぼす影響について検討した。噴霧乾燥条件は、入口温度、送液速度およびガス流量について検討した。入口温度およびガス流量が低く、送液速度が高い場合には、噴霧乾燥粒子が結晶化してしまう傾向が確認された。また非晶質複合体が調製できても、20から30℃程度の低いガラス転移点を示すため、40℃で保存したところ結晶化が確認された。一方で、入口温度およびガス流量が高く、送液速度が低い条件で調製した場合、噴霧乾燥粒子は非晶質状態で48℃付近のガラス転移点を示し、40℃で保存した場合にも結晶化が認められなかった。調製した非晶質複合体からのナリンゲニンおよびヘスペレチンの溶解性を検討したところ、ガラス転移点の高いサンプルは、高いナリンゲニンおよびヘスペレチンの溶解量を示した。以上のことから、噴霧乾燥条件は非晶質複合体のガラス転移点に大きく影響し、非晶質複合体の保存安定性や溶解性を検討する上で重要であった。

## 2. 助成期間内での研究成果の概要

## 1. はじめに

非晶質状態は、結晶状態に比べて高い溶解性が得られる。薬物結晶を非晶質状態へと変換するための基剤として、通常水溶性ポリマーが用いられる。近年、新たな非晶質形態として非晶質複合体が報告されている。非晶質複合体は主に、難溶性薬物と低分子化合物との間の分子間相互作用により、両化合物を共に非晶質状態へと変換する技術である。しかしながら非晶質複合体は、水溶性ポリマーを用いて調製した非晶質粉体と比較して低いガラス転移点を示すため、非晶質状態での安定性が課題となっている。噴霧乾燥法は、非晶質複合体を調製するための方法の一つであるが、噴霧乾燥条件が非晶質複合体形成に与える影響についてはこれまでに検討が行われていない。そこで本研究では、機能性食品への応用が期待される難溶性フラボノイド化合物の中で、ナリンゲニンとヘスペリジンがモル比1対1で形成する非晶質複合体について、噴霧乾燥条件である入口温度、送液速度およびガス流量が及ぼす影響について検討した。非晶質複合体のガラス転移点への影響を検討するとともに、非晶質状態の安定性および非晶質複合体からのナリンゲニンおよびヘスペレチンの溶解性を検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 使用物質

難溶性のフラボノイド化合物として、ナリンゲニン (Naringenin: NRG)およびヘスペレチン (Hesperetin: HPT)を用いた。Fig. 1 にナリンゲニンおよびヘスペレチンの化学構造を示す。

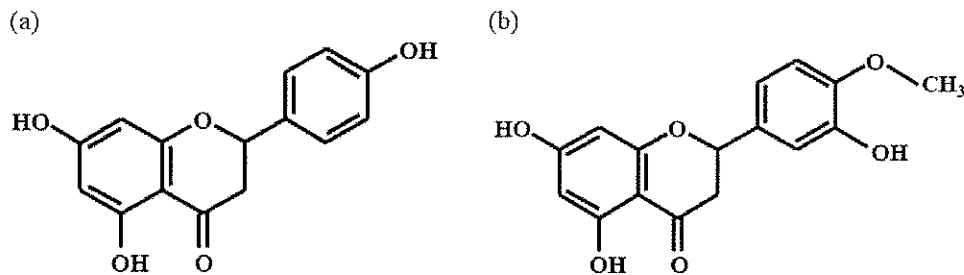


Fig. 1 Chemical structures of (a) Naringenin and (b) Hesperetin

### 2.2 噴霧乾燥法による粒子調製

モル比で 1 対 1 となるようにナリンゲニンおよびヘスペレチンをエタノール/水 (50/50, v/v)に溶解し噴霧乾燥法 (B-290 Büchi Mini Spray Dryer, BÜCHI Labortechnik AG.)により粒子の調製を行った。噴霧乾燥条件として、入口温度 (Inlet temperature)、送液速度 (Flow rate)およびガス流量 (Gas flow)を変化させ検討を行った。噴霧乾燥条件は Table 1 に示す。

Table 1 The condition of spray drying method

Formulation	1	2	3	4	5	6	7	8
Inlet temperature (°C)	120	120	120	120	150	150	150	150
Flow rate (mg/mL)	3	8	3	8	3	8	3	8
Gas flow (L/min)	35	35	55	55	35	35	55	55

### 2.3 噴霧乾燥粒子の物性評価

#### 2.3.1 結晶性評価

噴霧乾燥粒子 (Spray-dried particles: SDPs)の結晶性は、粉末 X 線回折測定 (Miniflex, Rigaku Co.)により評価した。X線は 15 mA, 40 kv で CuK $\alpha$  線を発生させ、5-35°の回折線を 0.02°/min のステップ幅と 4°/min の走査速度で検出した。

#### 2.3.2 ガラス転移点の評価

噴霧乾燥粒子のガラス転移温度の評価は、示差走査熱量測定 (DSC-7000X (Hitachi High-Tech Science Co.))により行った。3-5 mg のサンプルをアルミニウムパンに封入し、昇温速度 5°C/min、モジュレーション振幅 $\pm$ 3°C、モジュレーション周期 62.5 秒の条件下測定を行った。

### 2.3.3 保存安定性試験

保存安定性試験は、25 °C, 75 %RH および 40 °C, 75 %RH の条件下、密閉および開放容器中で 1 ヶ月保存後、2.3.1 に示す条件下、粉末 X 線回折測定により結晶性を評価した。

### 2.3.4 溶出試験

噴霧乾燥粒子からのナリンゲニンおよびヘスペレチンの溶解性評価は、小腸模擬液を用いて行った。ナリンゲニンあるいはヘスペレチン量として 1 mg/mL となるように 30 mL の小腸模擬液に添加し、15, 30, 60 および 120 分後にサンプリングした。その後、0.2 μm のフィルターでろ過後、HPLC (SPD-10A HPLC, Shimadzu Co., Ltd.)にて溶解したナリンゲニンおよびヘスペレチン量を定量した。HPLC 条件は以下に示す。カラム: A COSMOSIL 5C18-MS-II packed column (5 μm, 150 mm × 6.0 mm, Nakalai Tesque, カラム温度: 40 °C, 移動相: 0.1% (w/w) phosphoric acid/acetonitrile (65/35, v/v), 流量: 1.0 mL/min、注入量: 10 μL, 測定波長: 280 nm

## 3. 結果および考察

### 3.1 噴霧乾燥粒子の物性評価

Fig. 2 には、調製した噴霧乾燥粒子の粉末 X 線回折測定の結果を示す。Fig. 2 に示すように、噴霧乾燥後の粒子は、噴霧乾燥条件によって結晶状態が異なり、噴霧乾燥条件によっては、ナリンゲニンあるいはヘスペレチンの結晶が確認されるものと、ハローパターンを示すものが確認された。

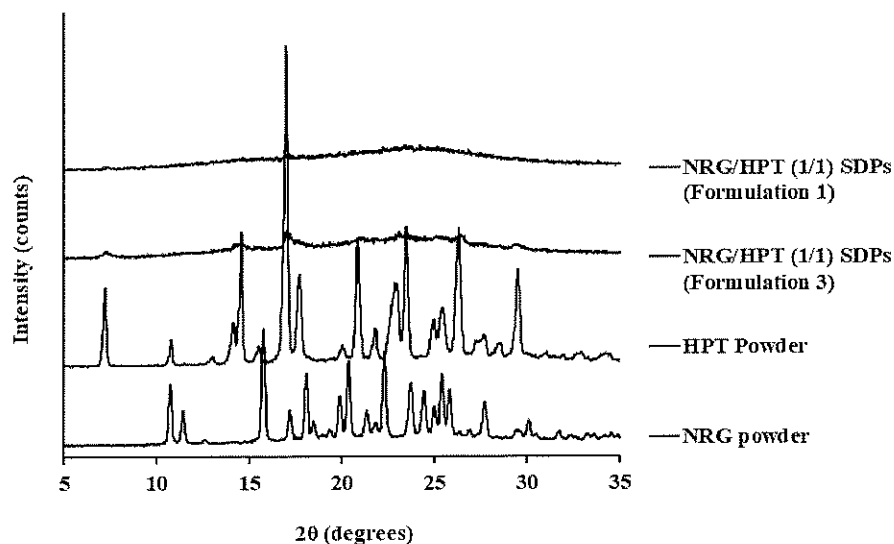


Fig. 2 Powder X-ray diffraction patterns of spray-dried particles

Table 2 には、処方 1 から 8 の結晶性およびガラス転移点、噴霧乾燥粒子の収率を示す。入口温度およびガス流量が低く、送液速度が高い場合に結晶化する傾向が認められ、さらに非晶質複合体を調製できても低いガラス転移点を示した。これは、乾燥が不十分であるため噴霧乾燥物中に水分が残り、結晶化あるいはガラス転移点の低下を引き起こしていると推察された。一方で、入り口温度およびガス流量が高く、送液速度が低い場合には、非晶質複合体が形成され、乾燥条件が最も良い処方 7 において最も高いガラス転移点を示した。

Table 2 Crystalline state, glass transition temperature and yield of spray-dried particles

Formulation	1	2	3	4	5	6	7	8
Crystalline state	C	C	A	A	A	C	A	A
Glass transition temperature (°C)	-	-	25.2	20.8	37.3	-	48.1	43.5
Yield (%)	65.5	67.2	38.8	25.2	42.9	63.8	47.8	43.3

A: Amorphous, C: Crystal

### 3.2 噴霧乾燥粒子の保存安定性評価

Table 3 には、噴霧乾燥粒子をそれぞれの条件で保存した後の結晶状態について示す。25 °C で密閉および開放容器中で 1 ヶ月保存した噴霧乾燥粒子は、いずれも非晶質状態を維持していた。一方で、40 °C で密閉および開放容器中で 1 ヶ月保存した噴霧乾燥粒子は、結晶化が確認された。40 °C 条件下、密閉容器中で保存した際には、処方 7 および 8 のみ非晶質状態を維持していた。これは、Table 2 に示されるように、処方 7 および 8 は、処方 3, 4 および 5 に比べて高いガラス転移点を示すため、分子運動性が低くなり結晶化が抑制されたと考えられた。しかしながら、開放容器で保存した場合には、非晶質粒子への水分の吸着によりガラス転移点が低下し、結果として全ての処方で結晶化したと考えられた。

Table 3 Change in crystalline state of spray-dried particles after preservation

Formulation	3	4	5	7	8
After 1 month at 25°C, 60RH (close)	A	A	A	A	A
After 1 month at 25°C, 60RH (open)	A	A	A	A	A
After 1 month at 40°C, 75RH (close)	C	C	C	A	A
After 1 month at 40°C, 75RH (open)	C	C	C	C	C

A: Amorphous, C: Crystal

### 3.3 噴霧乾燥粒子からのナリングニンおよびヘスペレチンの溶解性評価

Fig. 3 には、非晶質複合体を形成した噴霧乾燥粒子からのナリングニンおよびヘスペレチンの溶解性の結果を示す。非晶質複合体形成により、ナリングニンおよびヘスペレチンの溶出量は、ナリングニンおよびヘスペレチン原末と比べ上昇した。

非晶質複合体間において、ナリンゲニンおよびヘスペレチンの溶出量に違いが認められ、処方3および4は、処方5,7および8に比べて低い溶出量を示した。これは、処方3および4は、低いガラス転移点を有するため、溶出試験液中で結晶化あるいは相分離したためであると推察された。最も高いガラス転移点を持つ処方7は、ナリンゲニン及びヘスペレチンの最も高い溶出量を示し、原末と比較して、ナリンゲニンにおいて約2.3倍、ヘスペレチンにおいて約3倍の溶出量を示した。

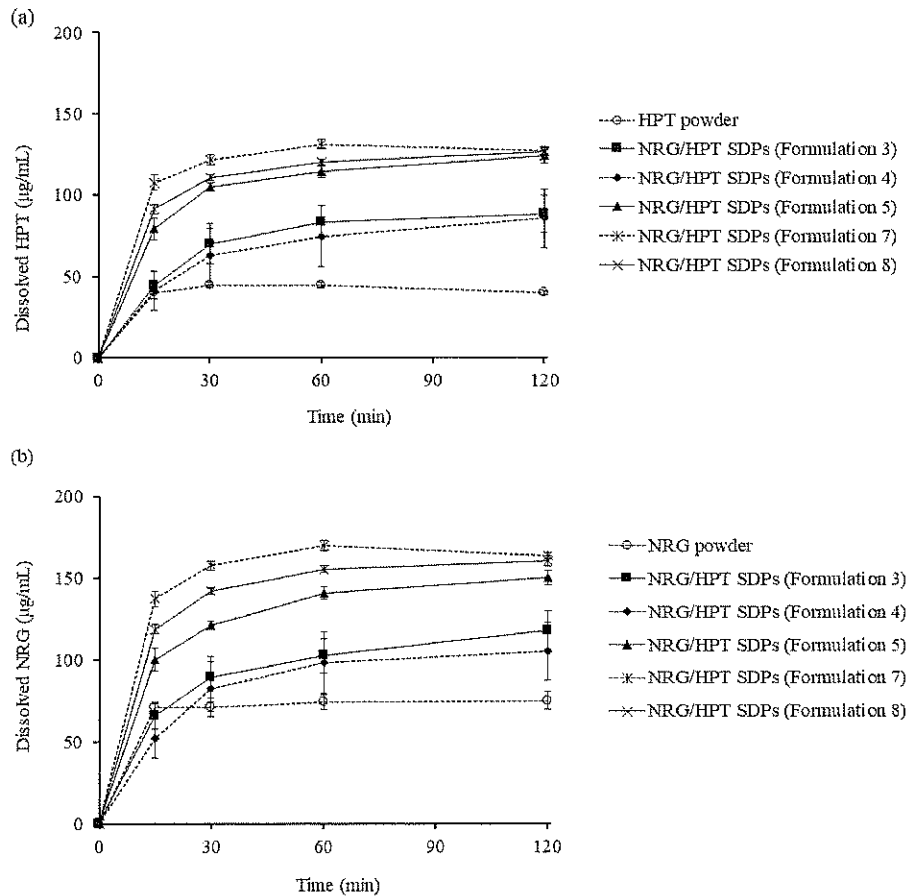


Fig. 3 Dissolution profile of (a) hesperetin (HPT) or (b) naringenin (NRG) from the spray-dried particles (SDPs) in simulated intestinal fluid (pH 6.5).

#### 4. まとめ

本研究において、噴霧乾燥条件が非晶質複合体形成に及ぼす影響について示すことができた。噴霧乾燥法の検討条件として入口温度、送液速度およびガス流量は、噴霧乾燥粒子の結晶状態だけでなく、非晶質複合体のガラス転移点にも影響した。ガラス転移点は、保存時の非晶質状態の安定性だけでなく、溶出試験時の化合物の溶出量にも寄与するため、非晶質複合体について検討する際には、噴霧乾燥条件は非常に重要になると考えられた。

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謝礼申し上げます。

### 3. 研究発表

#### 【学会発表】

1. 安藤大河、内山博雅、門田和紀、戸塚裕一、非晶質複合体化によるフラボノイド化合物の油成分への溶解性改善の検討、日本薬学会 139 年会、2019 年 3 月(千葉)
2. 内山博雅、安藤大河、門田和紀、戸塚裕一、難溶解性ポリフェノール化合物間での非晶質複合体形成の探索と製剤化、日本薬剤学会第 34 年会、2019 年 5 月 (富山)
3. 内山博雅、門田和紀、戸塚裕一、フラボノイド化合物間での非晶質複合体形成による溶解性および膜透過性改善、日本食品化学学会 第 26 回学術大会講、2020 年 5 月 (奈良)
4. 内山博雅、花本夕華、門田和紀、戸塚裕一、膜透過性改善を指向したコアモルフラス技術の構築とエマルションへの応用、70 回日本薬学会関西支部会、2020 年 10 月(滋賀)