

# 超臨界晶析法および超臨界抽出法による機能性製剤原料の開発

本城 政稔

福岡大学大学院 薬学研究科 臨床疾患薬理学教室

## Development of functionality material for supplement by supercritical crystallization and extraction method

Masatoshi Honjo

Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical science, Fukuoka University

### Abstract

Supercritical fluids are highly compressed gases at a temperature and pressure above their critical point. And, the many advantages of supercritical fluids come from their interesting or unusual properties which liquid solvents and gas carriers do not possess. That is, they can dissolve materials like liquids and effuse through solids like gases. And, by changing the pressure and temperature, the properties of supercritical fluids can be “tuned” to be more liquid- or more gas-like. In addition, close to the critical point, small changes in pressure or temperature result in large changes in density.

Supercritical fluids are suitable as a substitute for organic solvents in a range of laboratory and industrial processes. In particular, carbon dioxide is the most commonly used a supercritical fluid, called “supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>)”. Supercritical carbon dioxide is very popular fluid, as it is non-flammable, non-toxic, inexpensive and environmentally benign. And, SC-CO<sub>2</sub> is suitable for applications such as extraction and particle formation processes in the food industry.

In this study, we report about the possibility of SC-CO<sub>2</sub> extraction and particle formation technique.

**Keywords:** Supercritical fluid, supercritical carbon dioxide, SC-CO<sub>2</sub> extraction, Particle formation

### 緒言

超臨界流体とは、物質固有の臨界温度・臨界圧力を越えた領域における流体として定義され、いくら圧力を加えても液化しない非凝縮性の気体であり、通常の気体、液体とは異なる性質を示すユニークな流体である (Fig.1)<sup>1)</sup>。超臨界流体の特徴として、臨界温度をわずかに越えた領域において流体に対する物質の溶解度が、臨界圧力付近での圧力の増加に伴い、急激に増加することが知られている。このことは、圧力を減少させることで物質の溶解性を低下させることが可能であることを意味しており、減圧操作のみで溶質と超臨界流体との分離が可能であることを示している。

このように超臨界流体は、どこにでも忍び込む気体の性質 (拡散性) と成分を溶かしだす液体の性質 (溶解性) を併せ持つ。超臨界流体として用いられる頻度の高い物質は、二酸化炭素 (臨界温度  $T_c = 31.1^\circ\text{C}$ , 臨界圧力  $P_c = 7.38\text{MPa}$ ) であり、二酸化炭素を溶媒として、超臨界状態にある場合、超臨界二酸化炭素 (SC-CO<sub>2</sub>) と呼ばれる。超臨界二酸化炭素は、臨界温度が約  $31^\circ\text{C}$  付近と常温近傍で、安価且つ不燃性であり、人体に対しても無害であることから、グリーンケミストリーを具現化するための機

能性溶媒して、工業的利用が検討されている<sup>2,3-8)</sup>。

そこで本研究において、この超臨界二酸化炭素を利用した抽出法<sup>9)</sup>や晶析技術<sup>10-12)</sup>に着目した。本研究の目的は健康食品原料を用いて超臨界抽出法を利用することにより、有効成分の分離・分離抽出を行い、有効成分の高含有化における超臨界二酸化炭素抽出法の有用性検討を行うこと、並びに超臨界抽出法の発展させた超臨界晶析法による食品素材への機能性付与・物性改善を目指した、高機能カプセル化あるいは複合粒子化検討である。超臨界抽出においては、抗酸化作用を有する素材であるシリマリンに関し、他抽出法との経時変化に伴う抽出含量および抽出構成成分に関する検討を行った。超臨界晶析法に関しては、抗酸化作用を有する素材である $\alpha$ -リポ酸を用い、 $\alpha$ -リポ酸特有の味・においの軽減（マスキング）を目指した機能性粒子製造方法を検討し、得られた粒子の *in vivo* 吸収挙動に関する評価を行った。

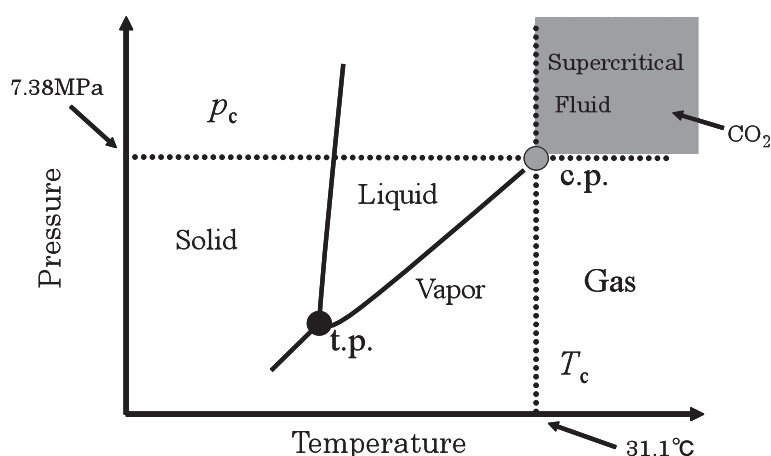


Fig. 1 Pressure-temperature phase diagram for a single-component material such as CO<sub>2</sub>

### (1) 超臨界抽出法を利用したシリマリン成分の抽出に関する検討

抗肝毒性の薬として知られているシリマリンは、近年、健康食品分野において抗酸化素材として注目されている。シリマリン類には、シリクリスチン、シリジアニン、シリピン、イソシリピン (Fig.2) が含まれており、それらはフラボリグナン類の混合物であり、抗肝毒性があるため、肝疾患の予防や治療に用いられる。シリマリン類は一般的に治療物質として認識されており、広範囲で肝疾患<sup>13)</sup>、前立腺癌<sup>14)</sup>、アテローム性動脈硬化症<sup>15)</sup>の治療に用いられている。なお他研究者により、キク科のオオヒレアザミで、一般にマリアアザミと呼ばれるこのハーブの種子からのシリマリン類の分離や抽出法が報告されており、Duらによるスケールアップカラムによる高速向流クロマトグラフィーを用いてのシリマリン類の抽出方法に関する報告<sup>16)</sup>、Engelberthらによる、圧縮熱水法によりマリアアザミの種子からのシリマリン類の抽出法の報告<sup>17)</sup>などがなされている。

近年、超臨界二酸化炭素による抽出法が、物質の分離法として注目されており、様々な分野で用いられている<sup>18-25)</sup>。CO<sub>2</sub>は無臭、無毒性、環境にも優しく、更に臨界状態に達しやすい物質である。このような利点があるにも関わらず、これまでのところシリマリン類のCO<sub>2</sub>への溶解性はとても低いため、CO<sub>2</sub>はシリマリン類の抽出に用いられていなかった。

本研究では、マリアアザミの種子からのシリマリン成分の抽出方法として、エントレーナー併用による超臨界二酸化炭素抽出法による新規抽出方法としての可能性検討を試みた。なおエントレーナーとしてメタノールを用いた理由としては、メタノールがHPLCによる分析などにシリマリンの溶剤としてよ

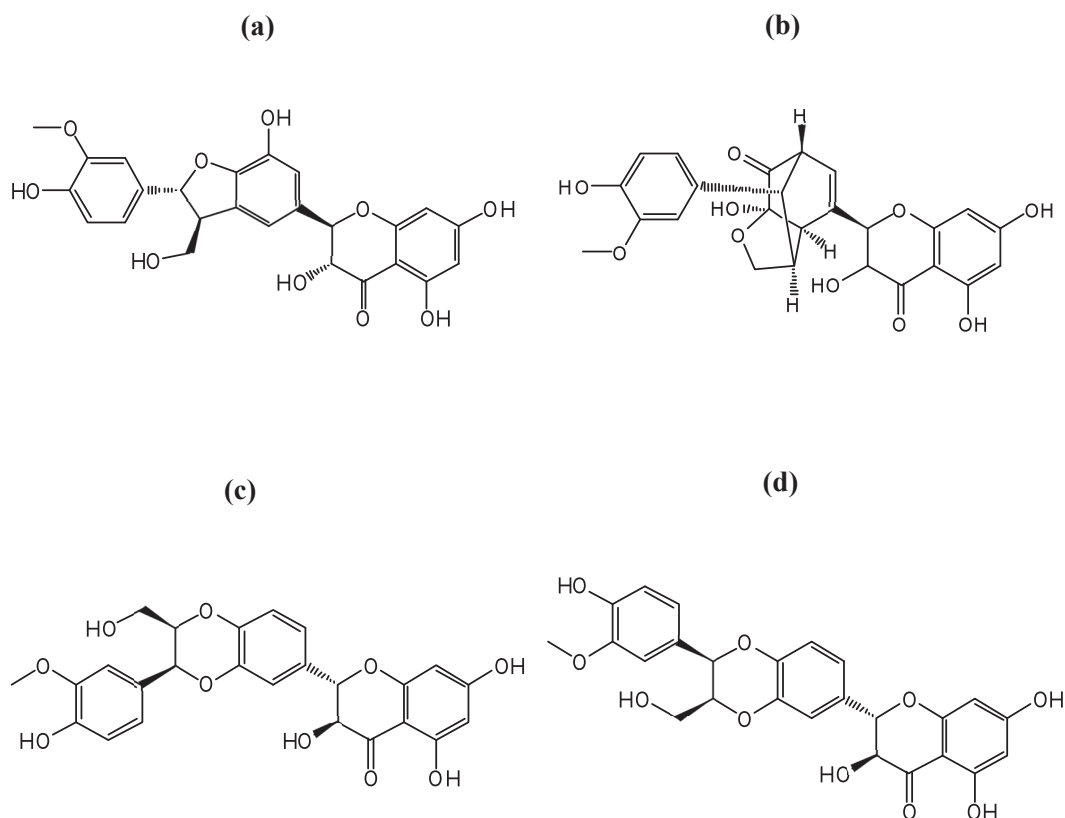


Fig.2 Chemical structures of (a) silychristin, (b) silydianin, (c) silybin, and (d) isosilybin

く用いられるためである。なお、比較検討抽出法として、一般によく用いられている有機溶媒法を選択し、使用有機溶媒としてメタノールを用いた。

そして、SC-CO<sub>2</sub>抽出法とメタノール抽出法によるシリマリンの分離・抽出に関し、同じ温度条件下にて比較検討を行った。なお、両抽出法において使用した試料は、マリアアザミの種子を凍結粉碎機にて粉碎したものをを用いた。二つの抽出過程の代表的なHPLCクロマトグラフをFig.3 ((a) 超臨界抽出法, (b) メタノール抽出法) に示す。

シリマリン標準試料の分析結果と比較すると、抽出後のクロマトグラムにおける主なピークは、シリピンA, シリピンB, シリクリスチン, シリジアニン, イソシリピンA, イソシリピンBのピークと一致することを確認した。なお、シリピンとシリジアニンは、立体異性体のAとBが存在する<sup>17)</sup>。メタノールをエントレーナーとした条件下でのSC-CO<sub>2</sub>抽出のクロマトグラムにおいて、シリピンA, シリピンB, シリクリスチン, イソシリピンAのピークの保持時間は、メタノール抽出法によるピーク保持時間とほぼ同じであった。しかしながら、イソシリピンBのピークに関し、この二つのクロマトグラムでは異なっていた。これは、抽出過程にてCO<sub>2</sub>の影響によるものと考えられる。Fig.3 (a)において、イソシリピンBの小さなピークは、40分前後の保持時間として観察されたが、Fig.3 (b)では、このピークは観察されなかった。このことにより、SC-CO<sub>2</sub>抽出でのクロマトグラムにおけるイソシリピンBのピークの出現は、おそらくメタノールをエントレーナーとして併用した場合において、ターゲット物質とCO<sub>2</sub>の相互作用によるものだと考えられた。また、イソシリピンAはイソシリピンBよりも極性が高く、CO<sub>2</sub>は非極性であるため、イオン化したターゲット物質は、SC-CO<sub>2</sub>抽出よりメタノール抽出の方がより多く抽出されるものと考えられた。なお、特に記述はしなかったが、308.2K (35℃) 条件下でエタノール

および水によるシリマリン成分の抽出実験を行なったが、メタノール抽出よりも劣っていたことをここに報告しておく。

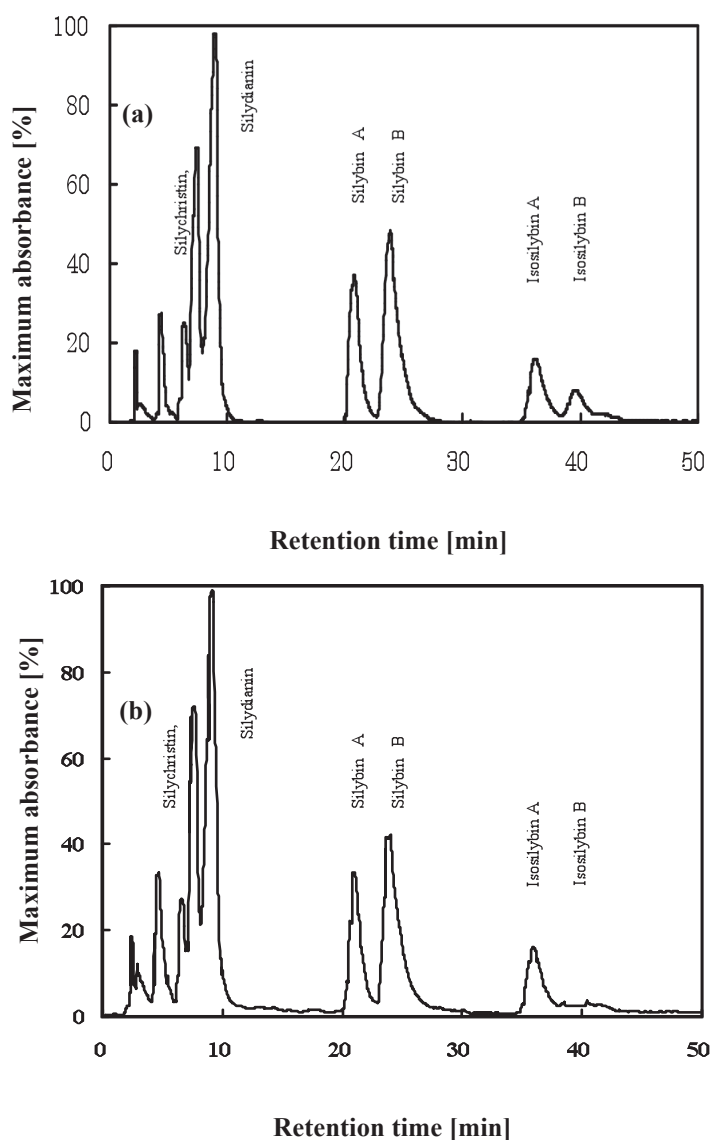


Fig. 3 HPLC chromatograms of (a) SC-CO<sub>2</sub> extraction with methanol as entrainer and (b) methanol extraction performed on powdered milk thistle seeds at 308.2 K

308.15K条件下、メタノールをエントレーナーとしたSC-CO<sub>2</sub>抽出法及びメタノール抽出法にて得られた各シリマリン成分量の経時変化グラフをFig.4に示す。初期の抽出段階（15分以内）において、全てのシリマリン各成分量は、抽出時間の経過とともに増加する傾向にあった。その後の抽出段階（15分以上）においては、SC-CO<sub>2</sub>抽出法では、全てのシリマリン各成分量は、ほぼ一定値、すなわちプラトー状態を示したが、メタノール抽出法においては抽出時間の経過とともに増加傾向を示した。しかしながら、メタノール抽出法における成分抽出量は、SC-CO<sub>2</sub>抽出法に比べると、かなり少ないことがFig.4に示されている。したがって、一定時間内（105分以内）での抽出効率に関し、SC-CO<sub>2</sub>抽出法はメタノール抽出法より優れており、その抽出量にはワンオーダーの差があることが示唆された。またこの理由として、SC-CO<sub>2</sub>は液体のメタノールよりも高い拡散性を有することに起因しているものと考えられた。

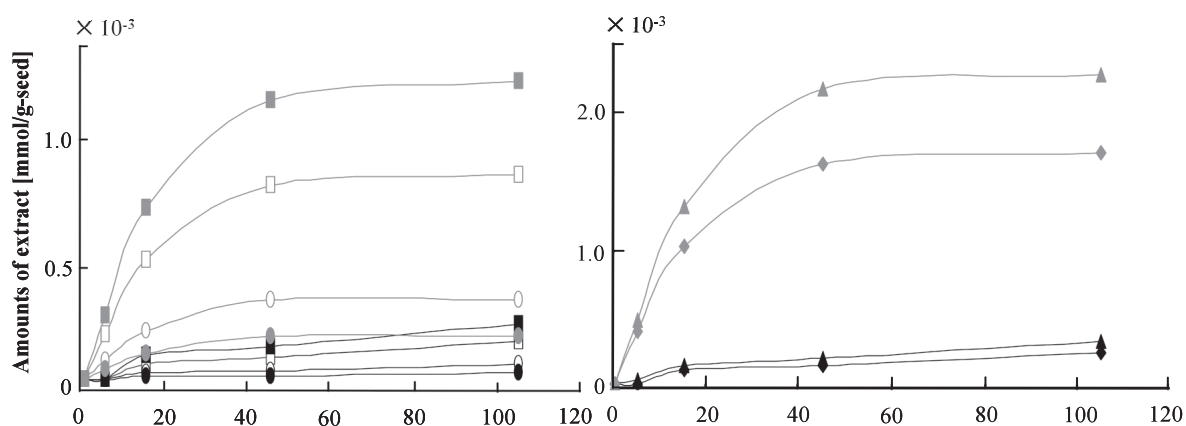


Fig.4 Amounts of individual silymarins extracted by SC-CO<sub>2</sub> extraction with methanol as entrainer (red line) and methanol extraction (black line) at 308.15 K; silybin A (□), silybin B (■), isosilybin A (○), and isosilybin B (●), silychristin (◆), silydianin (▲)

## (2) 超臨界晶析法を利用した $\alpha$ -リポ酸機能性複合粒子の開発

超臨界流体に物質が溶解することは古くから知られており、減圧により膨張、低密度化することで物質を晶析させる概念はすでに120年前にHannayとHogarthによって提唱されている<sup>26)</sup>。医薬品分野では有害な有機溶媒の代替品や粉碎時の媒体として期待され、医薬品の微粒子設計への応用検討もなされている<sup>1, 27-31)</sup>。食品分野においても有害な有機溶媒の使用は極力避ける傾向にあり、用途も制限されているのが現状である。

本研究において対象原料とした $\alpha$ -リポ酸 (ALA, Fig.5) は近年、広く認知されてきた代表的な抗酸化素材の一つである。ALAは1940年代の後半に発見された含硫ビタミン様作用物質で、生体内に広く分布している。ALAは極めて強い抗酸化活性をもつだけでなく、ビタミンC、E、コエンザイムQ<sub>10</sub>など、他の抗酸化物質の活性を復活させる働きも併せ持っている<sup>32-35)</sup>。欧米では主にコエンザイムQ<sub>10</sub>や、Lカルニチン、ビタミンCなどとの配合製品が多く、抗酸化、美容・美肌、抗糖尿、ダイエット効果などを訴求したサプリメントとして広く使用されている。このようなALAではあるが、その特性として極めて不快な味・においを有している。そこで、基材として菜種硬化油脂末 (HCO, Fig.6) を用いて、ALA特有の性質である不快な味やにおいの軽減 (マスキング) を目的とした機能性粒子の製造方法を検討し、得られた粒子に対し、ラットを用いた薬物吸収性評価を行い、機能性粒子としての有用性に関する検証を行った。

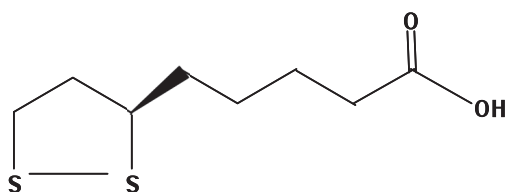


Fig.5 Chemical structure of ALA

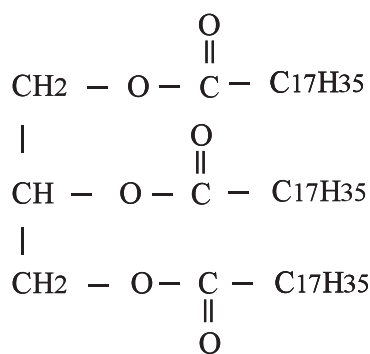


Fig.6 Chemical structure of HCO

## (2) -1 ALA/HCO超臨界複合粒子製造方法の確立

本研究に用いた材料特性を種々検討したところ、ALA/HCO超臨界複合粒子の調製には、比較的低温にて昇圧操作を行い、高压セル中にALAおよびHCOを高速攪拌操作にてよく分散させた後、昇温操作を行い、一定の温度・圧力を保持させた状態にて混合溶液を一気に大気圧下に噴出させることが重要であると考えられた。Fig.7にALA/HCO複合粒子調製方法の原理図を示す。本Fig.中(a)の原理は、まずALAおよびHCO粉末を高压セル内に投入し、約40℃付近まで昇温する。その後、CO<sub>2</sub>を注入し、攪拌時においてALAおよびHCOが粉末の状態を保持したまま、均一に分散する圧力値に到達させた(約8~13MPa)後、攪拌状態を保ちながら、昇温操作を行い、ALA/HCO両粉末が溶融する一定の温度まで上げる(60℃付近)。次に、一定温度を保持した状態にて適切な圧力値まで昇圧する(15~25MPa)。そして最後に、適切な温度・圧力状態を一定時間保持させた後、大気圧下に減圧噴霧することによりALA/HCO複合粒子を得る方法である。

Fig.中(b)の原理は、まずALAおよびHCO粉末を高压セル内に投入し、ALAが溶融する温度(約60℃付近)まで昇温させる。その後、攪拌しながら昇圧操作を行い、一定の温度・圧力状態を保持し、大気圧下に減圧噴霧することによりALA/HCO複合粒子を得る方法である。

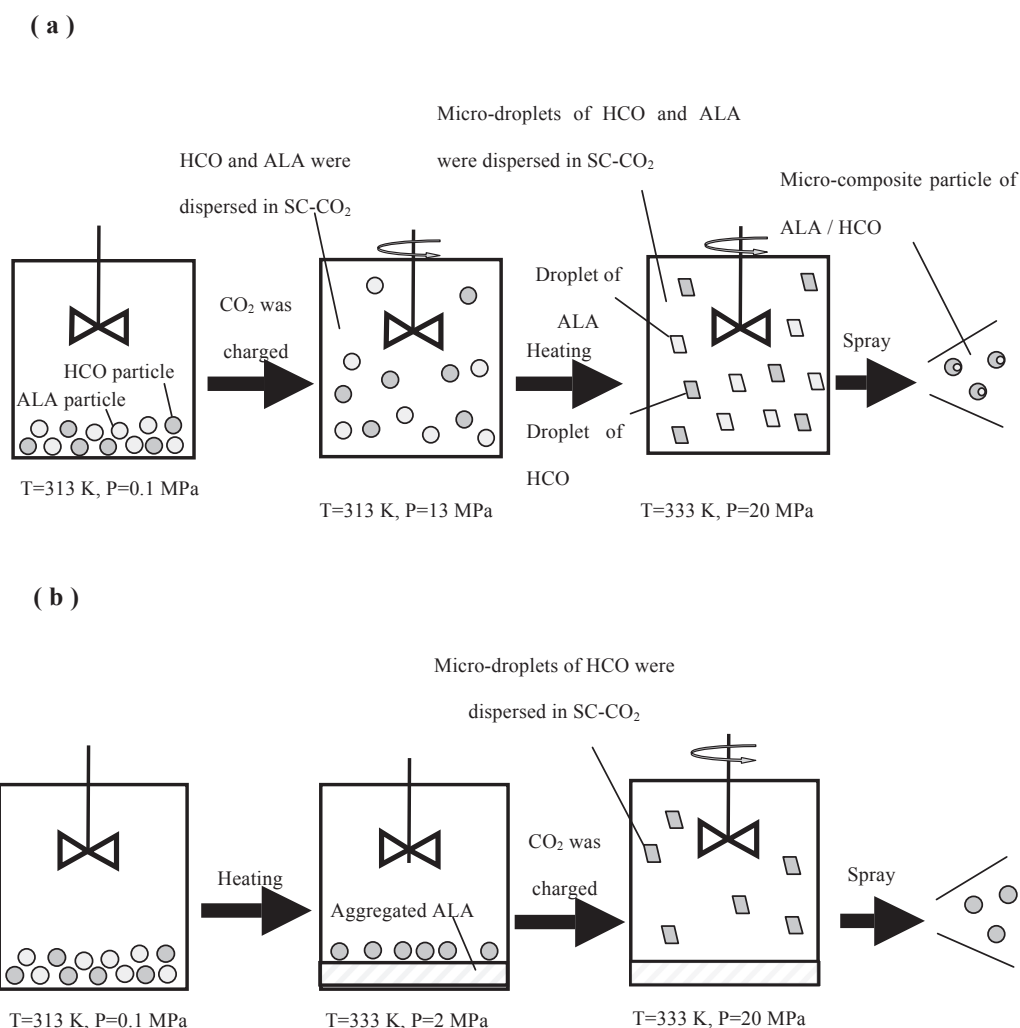


Fig. 7 Principle of formation of microcomposite particles of ALA/HCO, (a) by PGSS-STC, (b) by conventional PGSS

(a)においては、ALAとHCOの一定の配合割合にて仕込んだ場合、得られた粒子はほぼ仕込量と同配合比の複合粒子が得られるのに対し、(b)では、ALAの重合反応に伴い、混合溶液液中のALAの割合が少なくなり、得られる複合粒子中のALA含量は低くなるものと考えられた。そこで、このALA含量の低下を確認するため、ALAとHCO粉末を同仕込配合量(ALA:HCO=1:1)にて、各々(a)および(b)の製法に従い複合粒子を調製し、ALA含量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析したところ、(a)の製法により調製した複合粒子では、ALA含量が約47%(w/w)であったのに対し、(b)では約25%(w/w)という結果が得られた。したがって、(a)と(b)の製法において、その含量が約2倍と異なるため、(a)の製法がALA/HCO複合粒子製造方法として適切であると判断した。なお、この二つの製法は、超臨界二酸化炭素晶析法の一つである、ガス飽和溶液からの微粒子形成法(PGSS; Particles from Gas Saturated Solutions)<sup>6,36,37)</sup>であるが、ALA/HCO複合粒子の製造に関し、(a)の製法でなければ適切な粒子が得られ難いという事実より、(a)製法を用いたPGSS法をPGSS-STC(stepwise temperature control)と称することにした。

このようにPGSS法に工夫を施したPGSS-STCを新たに提案し、マス킹機能を有するALA/HCO超臨界複合粒子の製造が可能となった。

## (2) -2 ALA/HCO超臨界複合粒子の有効性確認

上述のように、不快な味やにおいをマス킹する機能を有する機能性粒子を得ることに成功したが、実際、服用した際にマス킹機能を有するものの、ALA原末と比較し、その有効性が保てなければ意味がない。そこでALA/HCO超臨界複合粒子がALA原末との生物学的同等性或いはそれ以上の吸収性向上効果が得られるかどうかを検証するため、Sprague-Dewley系ラット(6~8週齢,200~260g/匹)を用い、ALA/HCO超臨界複合粒子及びALA原末、更には市販ALAコーティング品であるMC-50F(ALA/HCO超臨界複合粒子とほぼ同じ配合比)を経口投与し、血中動態及び血漿中濃度を評価した。

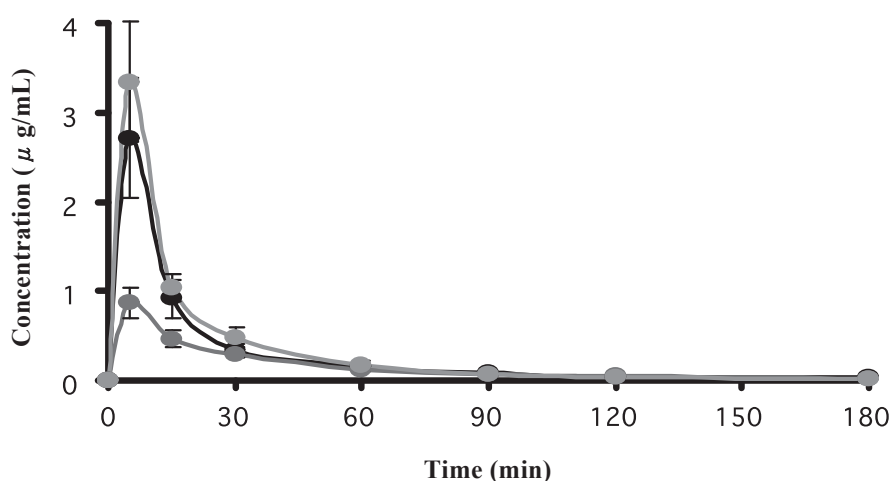


Fig. 8 Plasma levels of ALA after oral administration of ALA powder, MC-50F, ALA/HCO particles (equivalent to 30mg/kg) in rats ; ALA powder (●), MC-50F(●):MC-50F, ALA/HCO particles(●)

Fig. 8はALA原末、MC-50F、ALA/HCO超臨界複合粒子をラットに経口投与後の血漿中ALA濃度の時間推移を示す。すべての投与試料において、投与後5分で最高血中濃度(Cmax)に到達し、その後、90~120分で血中ALAが殆ど消失する挙動を示した。とりわけ、MC-50Fの最高血中濃度は他の粒子に比

べ、かなり小さい値を示した。

Fig.9はALA原末、MC-50F、ALA/HCO超臨界複合粒子をラットに経口投与した際のALAの血中濃度-曲線下面積（AUC）のグラフを示す。結果、MC-50FのAUCが最も小さい値を示すことが示唆された。また、tukey検定よりALA原末は他複合粒子と同等であるが、MC-50FとALA/HCO超臨界複合粒子間にて有意差を示す結果が得られた。

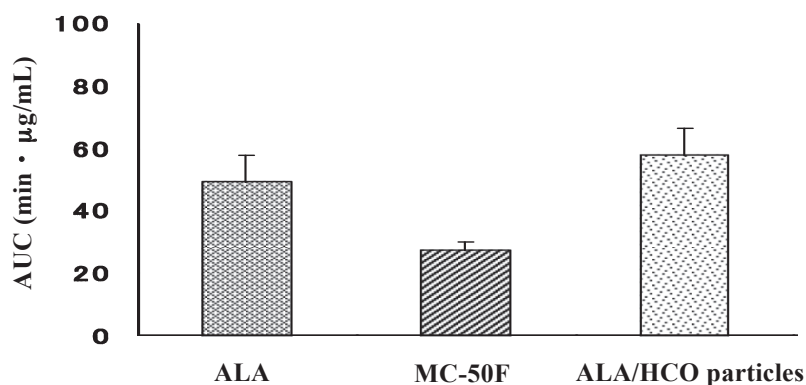


Fig.9 AUC values of ALA powder, MC-50F and ALA/HCO particles (equivalent to 30mg/kg) in rats  
mean ± SE, \*:p<0.05 tukey test

以上より、ALA/HCO超臨界複合粒子はALA原末と生物学的に同等であることが確認され、ALA/HCO超臨界複合粒子は味やにおいのマスキング効果を有するとともに複合化することによる有効性も維持した機能性粒子であることが示された。

## 結語

以上述べたように、シリマリン成分の抽出に関し、一定時間内における抽出含量は超臨界抽出法が優れていることが明らかとなった。また、超臨界晶析法を利用したALA複合粒子の開発に関しては、新たな製造方法を見出すことに成功し、得られたALA/HCO超臨界複合粒子は味やにおいのマスキング効果を有するとともに複合化後もALAの有効性を維持した機能性粒子であることが示された。

本研究で得られた知見は、超臨界晶析法によるマスキング粒子の製品開発への展開に関し、口腔内崩壊錠或いはチュアブル錠などの剤形への応用可能性が高く、抽出法に関しては、有効成分の高含有化に伴う製剤配合原料の低量化或いはコスト削減につながる可能性を有しているため、製剤開発における基礎的資料になるものと考えている。このように超臨界流体技術は健康食品分野の製剤領域における機能性粒子設計に関し、今後望まれるべく技術となることを期待している。

## 参考文献

- 1) 大竹勝人：超臨界二酸化炭素を用いた重合反応，オレオサイエン，1，395（2001）
- 2) Johnston, K. P.: *Nature*, 368, 187 (1994)
- 3) Anastas, P. T. and J. C. Warner, "Green Chemistry: Theory and Practice", Oxford University Press, New York (1998)
- 4) DeSimone, J. M., Z. Guan and C. S. Eisbernd: *Science*, 257, 945 (1992)
- 5) DeSimone, J. M., E. E. Maury, Y. Z. Menceloglu, J. B. McClain, T. J. Romack and J. R. Combes: *Science*,



- 256, 356 (1994)
- 6) Donohue, M. D., J.L.Geiger, A. A. Kiamos and K. A. Nielsen: "Green Chemistry: Designing Chemistry for the Environment"; Anastas, P. T. and T. C. Williamson ed., pp.152-167, American Chem. Soc., Washington, DC. (1996)
  - 7) Jessop, P. G., T. Ikariya and R. Noyori: *Science*, 269, 1065 (1995)
  - 8) Kendall, J. L., D. A. Canelas, J. L. Young, J. M. DeSimone: *Chem. Rev.*, 99, 543 (1999)
  - 9) M. Takahashi, H. Watanabe, J. Kikkawa, M. Ota, M. Watanabe, Y. Sato, H. Inomata, N. Sato, *Anal. Sci.*, 22, 1441 (2006).
  - 10) 井上均：高圧力の科学と技術, 12, 337 (2002)
  - 11) Jung, J. and M. Perrut: *J. Supercritical Fluids*, 20, 179 (2001)
  - 12) 山邊麻衣子, 内田博久, 松岡正邦：高圧力の科学と技術, 12, 331 (2002)
  - 13) K. Flora, M. Hahn, H. Rosen, K. Benner, *Am. J. Gastroenterol.* 93 (1998) 139-143.
  - 14) Z. L. Zi, R. Agarwal, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 7490-7495.
  - 15) N. Skottova, V. Krecman, *Physiol. Res.* 47 (1998) 1-7.
  - 16) Q. Z. Du, W.J. Cai, Y. Ito, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 25 (2002) 2515-2520.
  - 17) A. S. Engelberth, D.J. Carrier, E.C. Clausen, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 31 (2008) 3001-3011.
  - 18) K. Mishima, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 411-432.
  - 19) K. Mishima, K. Matsuyama, M. Baba, M. Chidori, *Biotechnology Progress* 19 (2003) 281-284.
  - 20) K. Mishima, K. Matsuyama, H. Ishikawa, K. Hayashi, S. Maeda, *Fluid Phase Equilibria* 194 (2002) 895-904.
  - 21) K. Mishima, K. Matsuyama, M. Baba, M. Ohuchi, T. Hakushi, *Solvent Extraction Research and Development-Japan* 8 (2001) 215-222.
  - 22) K. Mishima, K. Matsuyama, M. Baba, T. Hirabaru, S. Yamauchi, H. Tomokage, K. Takahashi, N. Yamasaki, *Journal of Chemical and Engineering Data* 46 (2001) 69-72.
  - 23) S. Maeda, K. Mishima, K. Matsuyama, M. Baba, T. Hirabaru, F. Ishikawa, K. Hayashi, *Journal of Chemical and Engineering Data* 46 (2001) 647-650.
  - 24) K. Mishima, S. Yamauchi, M. Ito, M. Ezawa, D. Tanabe, *Solvent Extraction Research and Development-Japan* 6 (1999) 176-181.
  - 25) K. Mishima, T. Tokuyasu, K. Matsuyama, N. Komorita, T. Enjoji, M. Nagatani, *Fluid Phase Equilibria* 144 (1998) 299-305.
  - 26) Hannay, J. B and Hogarth, J. : On the solubility of solid in gases, *Proc. Roy. Sec. (London)*, 29, 324 (1879)
  - 27) 荒井康彦監修：“超臨界流体のすべて”，テクノシステム，東京（2003）
  - 28) 斎藤正三郎監修：“超臨界流体の科学と技術”，三共ビジネス，仙台（1996）
  - 29) 三島健司，ケミカルエンジニアリング，43, 945 (1998)
  - 30) 三島健司，松山清，表面，36, 607 (1999)
  - 31) 三島健司，ファームテックジャパン，16, 45 (2000)
  - 32) B. C. Scott, O. I. Aruoma, P. J. Evans, C. O'Neil, A. Van der Vliet, C.E. Cross, H. Tritschler, B. Halliwell, Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants: A critical evaluation, *Free Radic. Res.* 20 (1994) 119-133.

- 33) G. P. Biewenga, G. Haenen, A. Bast, The pharmacology of the antioxidant lipoic acid, *General Pharmacology* 29 (1997) 315-331.
- 34) R. Weerakody, P. Fagan, S.L. Kosaraju, Chitosan microspheres for encapsulation of [alpha]-lipoic acid, *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 213-218
- 35) Biewenga, G.P., Haenen, G., Bast, A.:*General Pharmacology*, 29, 315-331 (1997).
- 36) Korc, J., S. Srcic, Z. Knez and P. Sencar-Bozic: *International J. Pharmaceutics*, 182, 33 (1999)
- 37) Weidner, E., M. Petermann, K. Blatter, and V. Rekowski: *Chem. Eng. Tech.*, 24, 529 (2001)