

<平成24年度助成>

特殊なスプレーノズルによる健康食品の 苦味有効成分マスキング技術の研究

尾 関 哲 也

(名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物送達学分野)

1. 緒 言

近年注目されている健康食品の有効成分の中には、苦味などの不快な味覚を伴う物が多いことが知られている。健康食品の分野において苦味をマスキングする技術として、単純に甘味物質 (Sweetener) を加えたり、一般に油状のものはソフトカプセルに含有させて摂取したりする方法、添加物として環状オリゴ糖であるシクロデキストリンを用いて目的の苦味成分を包接させるといった方法が知られている¹⁾。また、固形物のものに関しては、カプセル、錠剤の他、粉末 (スティックタイプ) のものも販売されている。一方で簡便な方法として、そのまま水に溶かして飲用したり、ミルク、野菜ジュースなどと混合して飲用されていることが多く、消費者の工夫に依存している。一方、苦味成分を健康的によいものであることを売りとして飲用を勧めている製品もあるが、これは消費者の嗜好に依存する。

これに対し、製薬の分野では、「良薬口に苦し」といわれるとおり、苦味をもつ薬物が多く、苦味をマスクする製剤技術の開発が活発に行われている²⁾。その背景として薬物の場合は食品とは苦味の強さの程度が異なること (のどの奥までしびれるほどの刺激の強い薬物・医薬品候補化合物が存在する) が挙げられる。

筆者らは、これまでに難水溶性薬物のナノ粒子をマイクロ粒子に含有させる研究 (ナノコンポジット) について研究を行ってきた^{3,4)}。これは、筆者らが開発した2液混合型スプレーノズルをスプレードラ

イヤーに装備してスプレードライすることにより、ナノコンポジットのパウダーが調製されるというものである。2液混合型ノズルは、2つの液体流路を有しており、一方からは担体水溶液 (例えば、マンニトール (MAN)) を、もう一方からは難水溶性の薬物の溶液の送液を行う。ノズル内でこれらの2つの溶液が混合する時、アンチソルベント効果 (溶解度の変化に伴う薬物析出現象: 図1) によって薬物がナノサイズで析出する。この溶液が噴霧、乾燥される事によってMANマイクロ粒子中に難水溶性薬物をナノサイズで分散させることが可能となる。

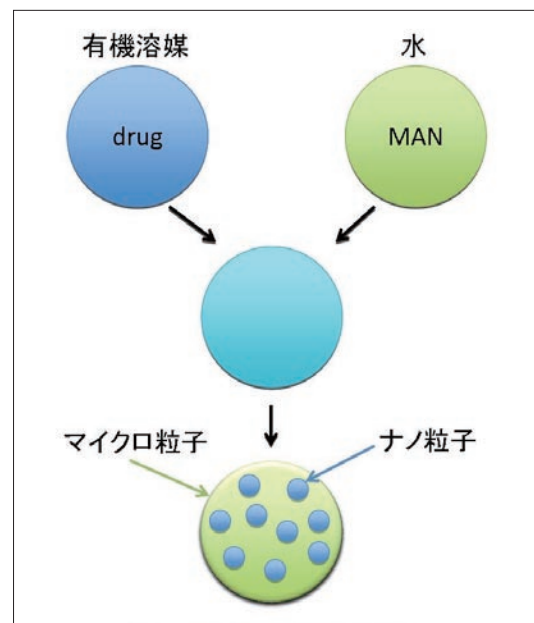


図1: アンチソルベント効果

これまでの検討により、ナノコンポジットパウダーに含有される難水溶性薬物のナノ粒子は保存安定性に優れ、またナノ化の恩恵を受けるため、消化管からの薬物吸収が改善するという報告も行ってきた^{5,6)}。このような研究背景により、筆者らは、

薬学分野で開発してきたスプレードライ技術は、食品分野における健康食品中の苦味有効成分のマスキング技術に応用できるのではないかという考えに至った。

そこで、本研究では、まず食品中に含まれている苦味成分・化合物の探索から開始し、我々の有するスプレードライ技術を用いた場合、どのような物質が適しているのかどうかを考察し、苦味有効成分が含有されるナノコンポジットパウダーの調製を行った。次に、研究内容をより効率化、単純化するために苦味成分のモデル化合物として苦味標準物質として知られている脂溶性化合物の Quinine (水溶性化合物の塩酸塩と区別) を用いた。ナノコンポジットパウダーを調製した場合、スプレードライ条件の最適化が重要であることがわかり、スプレードライ条件の最適化の検討を行った。定量的な苦味マスキングの評価を行うためにインテリジェントセンサーテクノロジー社の味覚センサーを用いて測定を行った。

そして、最後に、ナノコンポジットパウダーを用いた、口腔内崩壊錠の前検討を行った。口腔内崩壊錠は、製剤分野において、嚥下機能が低下しているため、錠剤が飲み込みにくい老人や小児を対象に開発された²⁾。これを応用し、水なしでも気軽に飲めるサプリメントとして、利用できるのではないかと我々は考え、口腔内崩壊錠タイプのサプリメントを作成することを目的として口腔内崩壊錠の検討を行った。

2. 実験方法

2.1 苦味有効成分の抽出

苦味有効成分を抽出するためにゴーヤを購入した。ゴーヤからの苦味有効成分の抽出方法は文献に従い、有機溶媒を用いた^{7,8)}。まず、ゴーヤにエタノールを加え、フードプロセッサーにより破碎し、一晩静置した。その後、ろ過を行い、ゴーヤから苦味有効成分を抽出した(図2)。その後、エバポレーションで濃縮し、固形の苦味有効成分を得た。



図2: 抽出されたゴーヤからの苦味有効成分

2.2 2流体ノズルを用いた Quinine (苦味有効成分) 含有ナノコンポジット粒子の調製

Quinine をアセトン/メタノール (2/1) 混液に溶解し、MAN は蒸留水に溶解させてスプレー溶液とした。Quinine 溶液を2流体スプレーノズルの一方の液路から送液し、MAN 水溶液をもう一方の液路から送液し、噴霧乾燥する事で Quinine 含有ナノコンポジット粒子 (Quinine/MAN) を調製した。また、ゴーヤより抽出した有効成分も Quinine と同様にスプレードライすることにより同様にゴーヤ有効成分含有ナノコンポジット粒子を調製した。スプレードライの条件検討として (1) Quinine のスプレー溶液の濃度、(2) Quinine 溶液の送液速度、(3) Quinine/MAN の組成比は、以下に示す条件でそれぞれ行った。その他の条件は、MAN 水溶液の濃度: 1.5 w/v%、MAN 水溶液の送液速度: 0.9 kg/h、入口温度: 200°C、スプレー圧: 0.1 MPa とした。

- ① (1) 0.15 w/v%、(2) 0.10 kg/h、(3) 1/70
- ② (1) 0.21 w/v%、(2) 0.10 kg/h、(3) 1/50
- ③ (1) 0.35 w/v%、(2) 0.10 kg/h、(3) 1/30
- ④ (1) 0.35 w/v%、(2) 0.13 kg/h、(3) 1/23
- ⑤ (1) 0.35 w/v%、(2) 0.18 kg/h、(3) 1/17
- ⑥ (1) 0.35 w/v%、(2) 0.30 kg/h、(3) 1/10

2.3 ナノコンポジット粒子中の Quinine 含有量の定量

紫外可視分光光度計を用いて Quinine 含有量について定量した。溶媒は 50% Ethanol とし、測定波長は 332 nm とした。

2.4 Quinine 含有ナノコンポジット粒子の形状観察

得られたマイクロ粒子について、走査型電子顕微鏡を用いて粒子形状の観察を行った。イオンスパッタを用いて、試料に約20ÅのPt/Pdコーティングを施して撮影した。

2.5 Quinine 含有ナノコンポジット粒子中に含まれる Quinine ナノ粒子の粒度分布測定

スプレードライ粒子(1mg)に Quinine 飽和水溶液(2ml)を加えて数秒間攪拌し、動的光散乱法を用いた粒子径分析装置を用いて、粒度分布を測定し、ピーク値を粒子径とした。同じ操作を3回繰り返した。

2.6 ポリマーを添加した Quinine/MAN マイクロ粒子の調製

Quinine とポリマーである EUDRAGIT[®] をアセトン/メタノール(2/1)混液に溶解し、MAN は蒸留水に溶解させてスプレー溶液とした。ポリマーの種類とポリマーのスプレー溶液の濃度を以下に示した。その他の条件は、MAN 水溶液の濃度:1.5 w/v%、Quinine 溶液の濃度:0.35 w/v%、MAN 水溶液の送液速度:0.9 kg/h、Quinine 溶液の送液速度:0.13 kg/h、入口温度:200℃、スプレー圧:0.1 MPa とした。

⑦ EUDRAGIT[®] S 100 0.35 w/v%

⑧ EUDRAGIT[®] S 100 1.05 w/v%

⑨ EUDRAGIT[®] E PO 0.35 w/v%

⑩ EUDRAGIT[®] E PO 1.05 w/v%

その後、ポリマーを添加した Quinine/MAN マイクロ粒子の形状観察を項目2.4と同様の方法で行った。また、ポリマー添加 Quinine/MAN マイクロ粒子中の Quinine ナノ粒子の粒度分布測定を項目2.5と同様の方法で行った。

2.7 味覚センサーを用いた Quinine 含有ナノコンポジット粒子の苦味マスキング効果の評価

味覚センサー(インテリジェントセンサーテクノロジー社)を用いて、苦味マスキングの評価を行った。まず、Quinine の検量線を作成するために、苦味味

覚センサー用基準液を用いて0.01 mM、0.03 mM、0.06 mM、0.1 mM、0.3 mM、0.6 mM の Quinine 溶液を調製した。また、味覚センサーを用いてこれらの溶液の酸性苦味、渋味、塩基性苦味、塩酸塩苦味を測定した。

次に項目2.2(④)、項目2.6(⑦、⑧、⑨、⑩)で調製した粒子の苦味マスキング効果を調べるために、各粒子をそれぞれ10 ml のシリンジに加え、味覚センサー用基準液10 mlを加えて30秒間転倒混和し、0.45 μm のメンブレンフィルターを用いてろ過し、サンプルとした。

2.8 口腔内崩壊錠の調製

口腔内崩壊錠が製造される大きさの白にナノコンポジット粒子(3.6 mg の Quinine を含有、初期検討ではスプレードライ MAN 粒子を代わりに用いた)、崩壊剤(Kollidon CL-SF)、滑沢剤(ステアリン酸マグネシウム(Mg-St))の混合物を合計300 mg 加え、杵で押さえた。その後、油圧プレスを用いて、圧縮を行うことにより、錠剤を作成した。口腔内崩壊錠の処方表は表1の通りとした。また、各処方に対してプレス圧を40、50、60 (kgf/cm²)として打錠を行った。

口腔内崩壊錠の評価として、硬度試験と崩壊試験を行い、錠剤の硬度と崩壊時間を測定した。

表1: 口腔内崩壊錠の処方

	処方1	処方2	処方3
ナノコンポジット粒子 (もしくはMAN粒子)	116mg	116mg	116mg
Pertek M100	151mg	136mg	121mg
Kollidon CL-SF	30mg	45mg	60mg
Mg-St	3mg	3mg	3mg
	300mg	300mg	300mg

3. 結果と考察

3.1. 食品中に含まれる苦味有効成分の探索

まず、筆者らは、果物38種類、野菜とキノコ48種類に含まれる有効成分と苦味の有無について調査した。代表的なものの結果を表2、3に示す。果物

ではイチゴ(アントシアニン、エラグ酸)、カキ(タンニン、リコピン、ベータカロテン)、バナナ(カロテン)、パッションフルーツ(ピセアタンノール)、ブドウ(アントシアニン、レスベラトロール)、ブルーベリー(アントシアニン)が苦味成分であることが明らかとなった(表2)。特筆すべきこととして、果物においては果実以外の部分、葉、茎、果皮といった我々が普段食さない部分に苦味成分が多く含有されていることが分かった。

野菜とキノコではゴーヤ(モモルデシン)、ジャガイモ(クロロゲン酸)、タマネギ(アリシン、ケルセチン)、トマト(リコピン、ルチン、ベータカロテン)、ナス(ナスニン)、ピーマン(クエルシトリン)、ブロッコリー(スルフォラファン)、レンコン(タンニン、ムチン)中に有効成分があり、そのうちの幾つかの野菜は苦味を有する物質が含有されていることが分かった。

今回の研究内容において、我々はゴーヤに焦点をあてた。ゴーヤは、モモルデシンやチャランチンなどのククルビタシン類が含まれており、これらは水に溶けにくいことが知られている。我々は、ゴーヤ中の苦味有効成分が本研究で使用するスプレードライ技術に適していると考えた。

3.2. 2液混合型スプレーノズルによる苦味有効成分含有ナノコンポジットパウダーの作成

まず、エタノールを用いて苦味有効成分を含む画分をゴーヤより抽出した。図2に示すようにきれいな緑色の液体が得られた。エバポレーションを行ったところ、実際に残った固形物はゴーヤ1個(約250g程度)に対し、約3gであった。その後、先述した2液混合型スプレーノズルを用いたスプレードライにより、苦味有効成分含有ナノコンポジットパウダーの調製に成功した。甘味を有する十分量のマンニトール中に苦味有効成分が含有されているた

表2: 果物の有効成分の調査結果

名称	有効成分	作用
イチゴ	アントシアニン(ポリフェノール)	抗酸化作用
	エラグ酸	美肌成分
カキ	タンニン(ポリフェノール)	抗酸化作用
	リコピン、β-カロテン	抗酸化作用、高血圧予防
バナナ	カロテン	抗酸化作用
パッションフルーツ	ピセアタンノール(ポリフェノール)	抗酸化作用
ブドウ	アントシアニン(ポリフェノール)	抗酸化作用
	レスベラトロール	食物アレルギー抑制
ブルーベリー	アントシアニン(ポリフェノール)	抗酸化作用

表3: 野菜・キノコの有効成分の調査結果

名称	有効成分	作用
ゴーヤ	モモルデシン	血圧降下作用、糖尿病治療作用
ジャガイモ	クロロゲン酸(ポリフェノール)	抗酸化作用
タマネギ	アリシン	抗酸化作用
	ケルセチン(ポリフェノール)	血管内皮機能改善
トマト	リコピン、ルチン、β-カロテン	抗酸化作用、血流改善
ナス	ナスニン	抗酸化作用
ピーマン	クエルシトリン	脂肪蓄積抑制、高血圧抑制、抗うつ作用
ブロッコリー	スルフォラファン	がん抑制効果
レンコン	タンニン	抗酸化作用
	ムチン(糖タンパク)	胃、目粘膜保護作用

め、その苦味は十分にマスキングされていると推察された。

しかし、検討を重ねていくにつれて、①ゴーヤから抽出される苦味有効成分はわずかであること、②ゴーヤのそれぞれのサンプルには個体差があるため、抽出成分の量、そして、苦味有効成分も大きく異なっており、その結果、苦味には大きなばらつきがでることが予想された。また、苦味有効成分の各成分は複雑なものであり、筆者らの有する解析技術では限界があることがわかった。この課題点を解決するために、筆者らは、苦味を有する単一の化合物に着目して苦味マスキングの研究を行うことにより、研究の効率化・単純化ができると考えた。そこで以降の研究では、Quinineを苦味のモデル薬物として用いる事とした。Quinineは難水溶性の薬物(塩酸塩は水溶性である)で、かつ強い苦味を有する。従って、この苦味モデル薬物の苦味マスキングが可能ならば、天然物から抽出された苦味有効成分の苦味マスキングも可能になると考えられた。

3.3 Quinine/MANマイクロ粒子の形状観察

スプレードライにより調製した、①～⑥のQuinine/MANマイクロ粒子のSEM画像を図3に示す。粒子径に大きな差は観察されなかった。形状はMANの割合が小さくなると、表面に針状の物質が多く観察された(⑤、⑥)。これはQuinineが表面に析出しているためであると考えられる。しかし、薬物の割合を小さくすると口腔内崩壊錠を作製した場合の薬物含有量も小さくなるので、ある程度薬物

含有量を維持する必要がある。よって、苦味マスキングを目的としたスプレードライ粒子の調製には、④の設定が適していると考えられた。

3.4 Quinine/MANマイクロ粒子中のQuinineナノ粒子の粒子径

Quinineナノ粒子の粒子径を図4に示す。本検討において、スプレードライの条件が粒子径へ与える影響はほとんどないと考えられる。しかし、粒子径のばらつきは、有機相の送液速度の増大に伴って大きくなっているため、ナノ粒子径の測定の結果においては、Quinineの割合が大きく、かつ粒子径のばらつきが小さい④の条件が適していると考えられる。

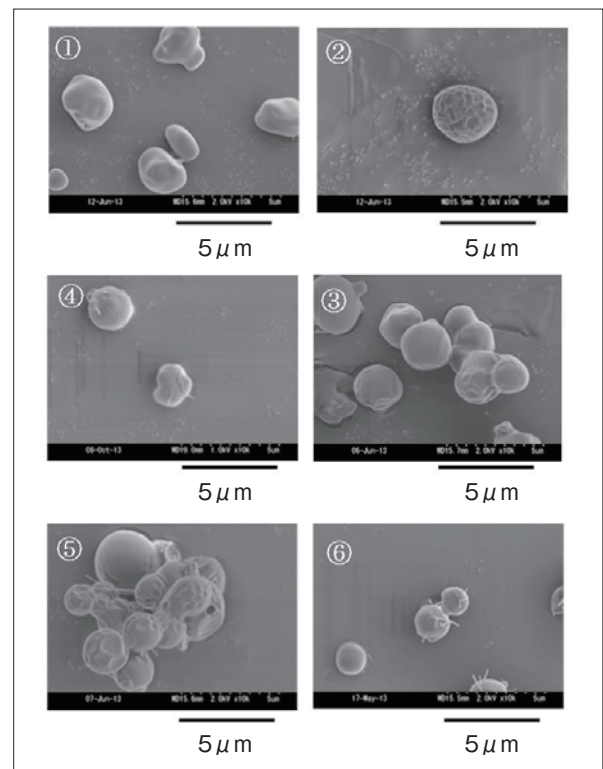


図3：スプレードライ粒子の電子顕微鏡写真

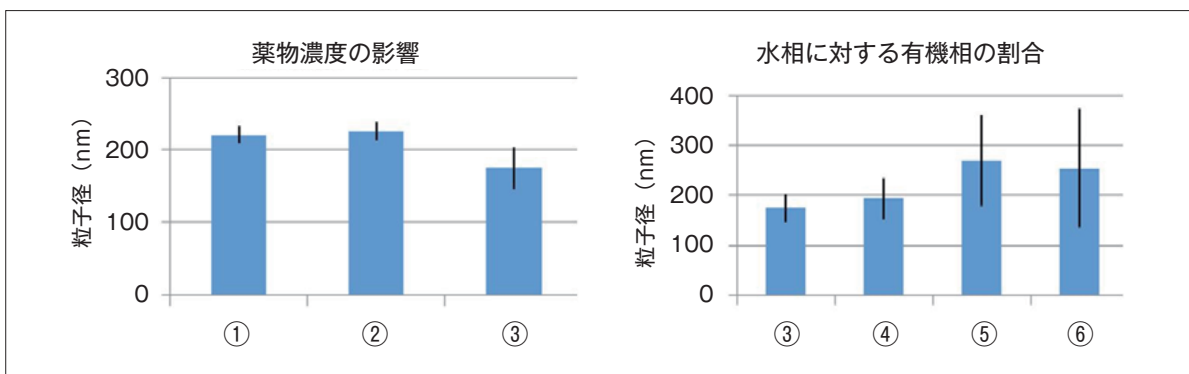


図4：スプレードライ条件がQuinine粒子の粒子径に与える影響

3.5 ポリマーを添加したQuinine/MANマイクロ粒子の形状観察

ポリマーを添加した Quinine/MAN マイクロ粒子の SEM 画像を 図 5 に示す。EUDRAGIT® S 100 を添加した ⑦、⑧ のスプレードライ粒子では球状の粒子は観察されなかった。原因としては噴霧後の乾燥が十分に行われていない可能性と、ノズル内で MAN 水溶液とポリマー添加 Quinine 溶液が混合した際にポリマーがナノ粒子化する事なく析出して MAN によって被覆されないまま乾燥された可能性が考えられる。これに対し EUDRAGIT® E PO を添加した ⑨、⑩ のスプレードライ粒子では球状の粒子が観察された。従って、口腔内崩壊錠の調製には ⑨、⑩ のスプレードライ粒子が適していると考えられる。

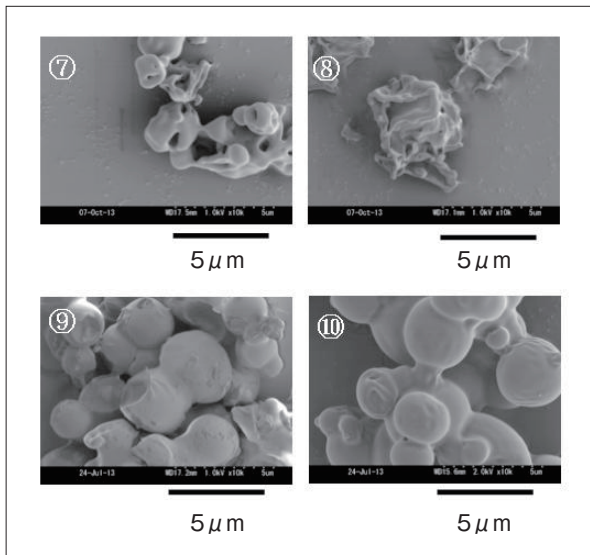


図 5: スプレードライ粒子の電子顕微鏡写真

3.6 ポリマー添加 Quinine/MAN マイクロ粒子中の Quinine ナノ粒子の粒子径

⑨ のスプレードライ粒子中に存在する Quinine 粒子の粒子径を測定したところ、平均 155.2 ± 17.0 nm の粒子が観察された。よって、⑨ の条件ではポリマーを添加した Quinine/MAN マイクロ粒子の調製に成功した。これに対し、⑦、⑧、⑩ のスプレードライ粒子を Quinine 飽和水溶液に加えて攪拌した所、白く濁った。1.2 μm のメンブレンフィルターを用いて濾過し、その濾液を用いて粒子径を測定したところ、粒子の存在が確認できなかった。しかし、紫外可視分光光度計によって Quinine が含有されている事は確認された。よって、⑦、⑧、⑩ の場合は、Quinine ナノ粒子がフィルターに吸着した可能性と、Quinine がナノ粒子化しておらず、フィルターにトラップされている可能性が考えられた。

3.7 スプレードライ粒子の苦味マスキング効果

味覚センサーを用いて Quinine 溶液を測定し、結果を解析したところ、評価対象となる味覚は塩基性苦味と塩酸塩苦味であり、他の渋味、塩味、酸味について、基準溶液と比較して変化はなかった。また、Quinine は濃度依存的に苦味の増加を示しており、定量可能であることを確認した (Data not shown)。

次に味覚センサーを用いて Quinine またはスプレードライ粒子の苦味強度を測定した結果を評価対象となる塩基性苦味と塩酸塩苦味について 図 6 に示す。④ のようにスプレードライを行う事によって、

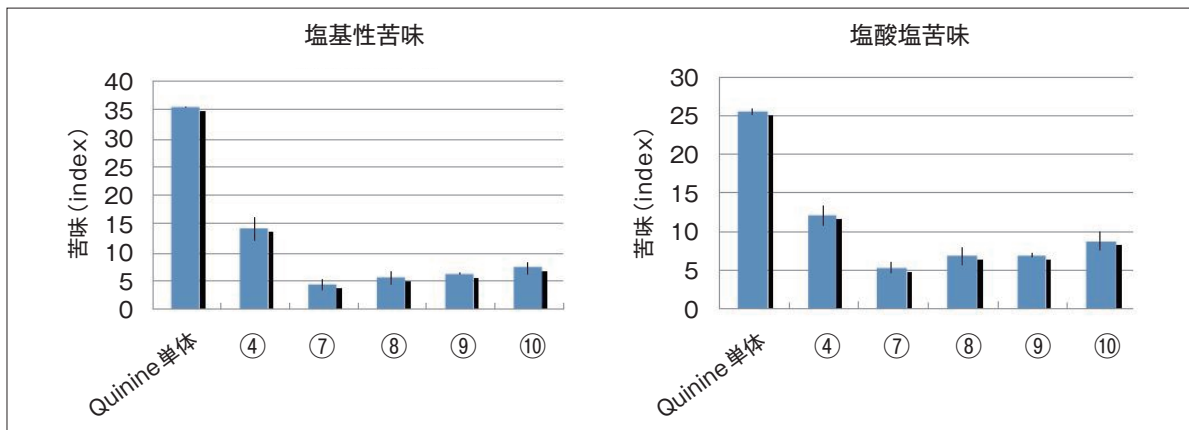


図 6: ナノコンポジット粒子の苦味マスキング効果

苦味がマスキングされることが示された。また、ポリマーを含有させることにより、さらに苦味がマスキングされた。これは、ポリマーを添加することで、苦味成分である Quinine の溶出速度が減少したことに起因すると推察された。

3.8 口腔内崩壊錠の崩壊時間と硬度

スプレードライ粒子の代わりにMANを用いて調製した口腔内崩壊錠の崩壊時間と硬度の平均値を図7に示す。口腔内崩壊錠の条件は崩壊時間が30秒以内であり、かつ錠剤硬度は一般的に3~7kgである事が望ましいとされている。よって本検討の結果から、処方2のプレス圧 50 kgf/cm² が適していると考えられる。よって、スプレードライ粒子を用いた口腔内崩壊錠の調製はこの条件を採用した。最後に④のスプレードライ粒子を用いて口腔内崩壊錠を調製し、崩壊時間を同様の方法で3回測定した結果、平均22秒であった。よって、苦味マスキング効果のあるスプレードライ粒子を用いた口腔内崩壊錠の調製に成功した。本研究で用いた Kollidon CL-SF は一般的に1~5%程度の添加量で優れた崩壊性を示す。しかし、本研究では15%添加する必要がある。これは、スプレードライ粒子、崩壊剤、滑沢剤を混合する際にビニール袋を用いた簡便な混合を行ったためと考えられる。よって、試薬を混合する際に造粒の工程を追加し、今後も検討を重ねていく必要があると考えられる。

4. 最後に

以上、我々が保有している2液混合型ノズルによるナノコンポジット粒子作成技術により、苦味有効成分含有ナノコンポジット粒子、Quinine含有ナノコンポジット粒子を調製することができた。ナノコンポジット化により苦味を軽減できることが示唆された。また、口腔内崩壊錠の作成の検討により、手軽に摂取するサプリメントの前検討ができたものと考えられる。今後、さらなる検討が必要であるが、新規苦味マスキング技術の新しい研究アプローチを示すことができたと考えている。

謝 辞

最後になりましたが、本研究を遂行するにあたってご支援いただいた(公財)浦上食品・食文化振興財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Morishita T., Hirakawa Y., Uehara T., Satooka Y., Kawano M. Bitterness Reduction for Utilization of Bitter Gourd (*Momordica Charantia*). 宮崎工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告. 平成13年度 No.46 (2001)
- 2) PLCM (耕薬) 研究会編集. 「口腔内崩壊錠ハンドブック」(株)じほう. 28(2), 2012
- 3) Ozeki T., Akiyama Y., Takahashi N., Tagami T., Tanaka T., Fujii M., H. Okada. Development of novel and customizable two-solution mixing type nozzle for one-step preparation of nanoparticle-containing microparticles, *Biol. Pharm. Bull.* 35(11), 1926-1931 (2012).

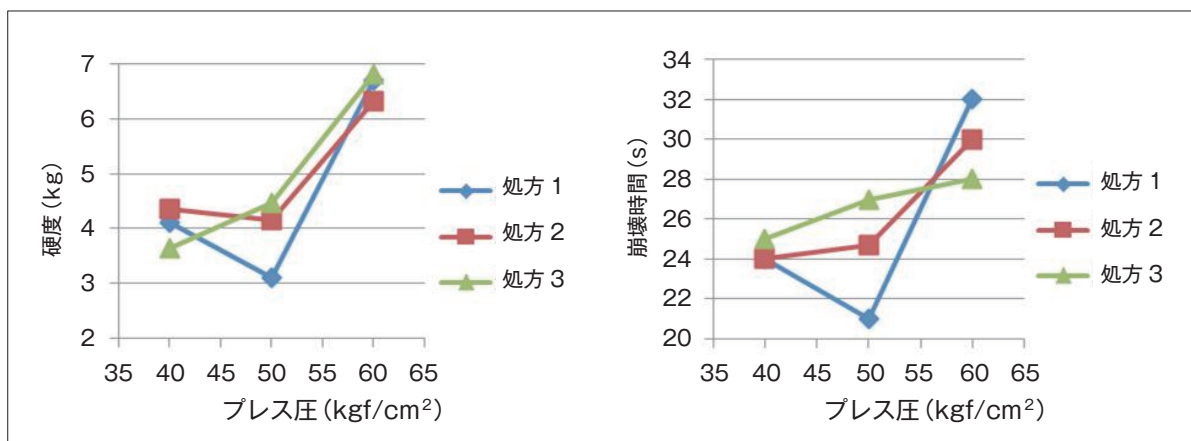


図7: 口腔内崩壊錠の処方設計とプレス圧が硬度と崩壊時間に与える影響

-
- 4) Nishino Y., Kanazawa T., Takashima Y., Ozeki T., Okada H., Improved intestinal absorption of a poorly water-soluble oral drug using mannitol microparticles containing a nano-solid drug dispersion, *J. Pharm. Sci.* 101(11), 4191-4200 (2012).
 - 5) K. Ohashi, T. Kabasawa, T. Ozeki, and H. Okada. One-step preparation of rifampicin/poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles-containing mannitol microspheres using a four-fluid nozzle spray drier for inhalation therapy of tuberculosis. *J. Control. Release*, 135, 19-24 (2009)
 - 6) T. Mizoe, T. Ozeki, H. Okada. Preparation of drug nanoparticle-containing microparticles using a 4-fluid nozzle spray drier for oral, pulmonary, and injection. *J. Control. Release*, 122, 10-15 (2007)
 - 7) Puspawati NM. Isolation and identification Momordicin I from leaves extract of *Momordica charantia* L. *JURNAL KIMIA* 2 (1), 53-56 (2008)
 - 8) Yasui H. Identification of antifeedants in bitter gourd leaves and their effects on feeding behavior of several lepidopteran species. *JARQ* 36(1), 25-30 (2002)

Development of bitterness-masking technology by using a spray dryer equipped with a unique spray nozzle

Tetsuya Ozeki

*Drug Delivery and Nano Pharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Nagoya City University*

Bitterness of health foods is an obstacle for the continuous use because strong bitterness of the health foods makes users uncomfortable. Taste masking (bitterness masking) is an important method for the users to take the foods comfortably. Since the effect of bitterness masking is dependent on the characteristics of the food, various methods including the use of sweeteners, soft capsules and cyclodextrins have been extensively developing. In the present study, as a novel method of bitterness masking, the mannitol (MAN) microparticles containing bitter nanoparticles (nanocomposite particles) were prepared by a using spray dryer equipped with a unique “two solution mixing type spray nozzle”. The extract from bitter gourd and quinine was used for the model of bitter materials. First, the condition of optimal spray drying was investigated. (1) concentration and (2) velocity of organic solvent (quinine solution), (3) the mixing ratio of MAN and quinine solution affected the formation of nanocomposites and/or bitter nanoparticles. After the optimization, relatively smaller nanoparticles (<200 nm) could be obtained. Bitterness masking was evaluated and determined by using an artificial taste sensor. The nanocomposite containing Eudragit polymer remarkably reduced bitterness. Although the detail mechanism is unclear, the polymer might affect the dissolution rate of quinine. In order to extend our study, orally disintegrating tablets including nanocomposite particles were prepared. After optimization, the tablets were disintegrated within 30 second, in while the tablets had appropriate hardness (3-7 kg). These results mean that the tablets which were prepared in our experiment were suitable for orally disintegrating tablets.

In conclusion, the nanocomposite particles prepared by our original spray drying method showed the reduced bitterness. This novel method will be a useful for bitterness masking of healthy foods. The orally disintegrating tablets containing nanocomposite particles will be an attractive supplement from which users can take healthy foods easily and friendly.