

ヒノキチオール包接複合体の安定性評価

(計画年度：平成 29～30 年度)

研究代表者水・食品担当 坂田脩，鎌苅有華，渡邊美穂，山元梨津子，原和代，吉田栄充

共同研究者 城西大学 井上 裕

はじめに

ヒノキチオール（以下，HT）は天然由来成分であり，香料や食品添加物（保存料）として使用されている。また，幅広い抗菌スペクトルを持ち，院内感染で問題となっている MRSA に対しても抗菌性を示し，耐性菌もできにくいとされている¹⁾。そこで近年，薬剤耐性菌を防ぐためにもヒノキチオールが天然由来の機能性香料として注目されているが，揮発性が高いことから，長期的にその効果を発揮することができない。そこで，揮発性を抑え，長期的に効果を発揮するための製剤的技術が不可欠であり，その 1 つとして，包接化が考えられている。

井上らは，水溶性が低い HT を水に溶解しやすくするために，シクロデキストリン（以下，CD）と包接化させる方法を開発し，その包接複合体が HT 単体よりも高い抗菌活性を持つことを報告している²⁾。しかし，包接複合体の揮発性に関しては検討していない。また，HT は光分解が報告されている³⁾ため，その検討も踏まえ，当所は井上らと協力し，HT の照射下での安定性と包接複合体中 HT の揮発性に関して調査を行ったので報告する。

方法

1 試料

CD はグルコピラノースが α -1,4 グルコシド結合によって環状に結合した構造をとり，グルコピラノースの数により， α CD， β CD， γ CD に分けられる。

そこで，HT/ α CD，HT/ β CD および HT/ γ CD をモル比 2/1，1/1 および 1/2 で秤量し，ボルテックスミキサーを用いて 1 分間混合した。その後，それぞれ 1g をアルミナセルに充填後，振動型ロッドミルを用いて 60 分間混合粉碎したものを混合粉砕物（以下，GM）とした。また，シクロデキストリンを加えずに HT のみで上記操作を行ったもの（以下，HT Ground）も調製した。

2 標準品及び試薬等

HT は富士フィルム和光純薬（株）製，CD は（株）シクロケムバイオ製の標準品を用いた。

3 装置

装置は HPLC に waters 社製 e2695，島津製作所社製 NexeraX2 を用い，GC/MS はアジレント社製の 6890N 及び

5973 を，GC/QTOF-MS はアジレント社製 7890A，7200 を用いた。

4 照射下での HT 分解物同定の検討

照射下での HT 分解物を調べるため，医薬品の安定性を評価するのに用いられている，安定性試験ガイドライン⁴⁾の苛酷試験に基づいて試験を行った。HT を温度 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，白色蛍光灯 700lm（総照度 120 万 Lux・hr）で 1 か月保存した試料を，HPLC 及び GC/QTOF-MS で測定した。

5 包接複合体における HT の安定性評価

HT 及び各 GM を温度 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，白色蛍光灯 700lm（総照度 120 万 lx・hr）で保存したものを，調製直後，24 時間後，48 時間後に HPLC を用いて HT 濃度を定量し，HT の残存率を求めた。

6 包接複合体における揮発性評価

HT 及び各 GM を真空条件下で調製直後，24 時間後，48 時間後に HPLC を用いて測定した。また，透明バイアルに密封したものを，温度 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，白色蛍光灯 700lm（総照度 120 万 lx・hr）で保存し，固相マイクロ抽出（以下，SPME）を用いて，GC/MS で測定した。

結果

1 照射下での HT 分解物同定の検討結果

HPLC 及び GC/QTOF-MS を用いて測定したが，HT 以外のピークは認められなかった。

2 包接複合体における HT の安定性評価

HPLC を用いて定量したところ，調製直後と比較して，時間の経過とともに HT 及び各 GM の残存率は，調製直後と比較していずれもやや低下した。

3 包接複合体における HT の揮発性評価について

真空条件下で保存したものを HPLC で測定した結果，真空条件下の方が，非真空条件下よりも残存率は低下しており，調製直後と比較して HT，HT/ α CD 及び HT/ β CD は 48 時間後に残存率が 50%未満であったが，HT/ γ CD は 48 時間後も 80%以上も残存しており，顕著に残存率が高かった。

また，SPME を用いて GC/MS で測定したところ，HT と比較して，HT/ γ CD は SPME にて抽出される量が 1/4 未満であった。

考察

HT に光を照射することで光環化反応が進行することが

報告されているが、苛酷試験に基づいた光照射条件下では、HPLC及びGC/QTOF-MSの両機器ともHTのピークのみが検出された。そのため、今回行った条件下では、HTの光分解反応は進行しないと考えられた。

また、温度 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、白色蛍光灯 700lm (総照度 120 万 $\text{lx}\cdot\text{hr}$) で保存した HT 及び包接複合体を HPLC 測定で定量した結果、HT の残存率が減少していることを確認した。しかし、本条件では HT の光分解反応は進行しないことから、HT が気相中に揮発したことにより、残存率が低下したと考えられた。

そこで、真空条件化で保存した HT 及び各 GM を HPLC で定量したところ、HT の残存率が非真空条件下よりも低下していた。したがって、真空吸引保存において HT の揮発が促進されたことが確認された。また、SPME を用いて GC/MS で測定した結果を踏まえると、HT/ γ CD の GM は HT よりも高い残存率を示すことから、HT は γ CD と複合体を形成することでより安定になり、HT の揮発を抑制すると推察された。

まとめ

今回の検討により、苛酷試験における光照射条件下では HT の分解物は生成しないと考えられた。

続いて実施した包接複合体における HT の安定性及び揮発性評価から、HT は気相中に揮発することで残存率が減ること、また、HT/ γ CD の GM が高い残存率を示すことから、HT は CD と包接複合体を形成することで、HT の揮発を抑えられることが推察された。

今後は、これらを使用した製品の開発等が期待される。

謝辞

試料の提供及び実験に協力いただいた城西大学薬学部准教授井上裕先生、博士課程鈴木莉奈氏に感謝いたします。

文献

- 1) YH. Shih, DJ. Lin et al.: Evaluation physical characteristics and comparison antimicrobial and anti-inflammation potentials of dental root canal sealers containing hinokitiol in vitro. PLoS One. 9(6), e94941, 2014
- 2) R. Suzuki, Y. Inoue et al.: Effect of γ -cycrodextrin derivative complexation on the physicochemical properties and antimicrobial activity of hinokitiol. J Incl phenom Macrocycl Chem. 83, 177-186, 2015

- 3) K. Tanaka, R. Nagahiro et al.: Enantioselective Photoreaction of Achiral Tropolone Ether in Inclusion Crystals with Optically Active Host Compounds. CHIRALITY. 14, 568-572, 2002
- 4) 平成 15 年 6 月 3 日付け医薬審発第 0603001 号 厚生労働省医薬局審査管理課長通知「安定性試験ガイドラインの改定について」