

# シクロデキストリンを用いたサーファクタントフリーエマルションの安定化メカニズムの解明

明治薬科大学

井上 元基

Surfactants are essential to prepare emulsions. However, some kinds of surfactants show adverse effects on the human body or environments. Consequently, many researchers are attempted to prepare emulsion without use surfactants called surfactant-free emulsions. Emulsion stabilized by cyclodextrins has been reported by many researchers in 90s. Although these reports focus on preparation and application for practical use, improving the physical property of the emulsion has many problems due to a lack of the formation mechanism. In this study, the formation mechanism of emulsion using cyclodextrin as emulsifier was investigated by physicochemical and spectroscopic methods. Water in oil type emulsion was prepared in the case of the use of hydrophobic group modified cyclodextrin. From the stability tests and droplet size measurements, the emulsion was destabilized by creaming. The surfaces of droplets were covered with precipitates by cryo-SEM observation. Therefore, this emulsion was classified as Pickering emulsion, which defined as stabilized by adsorption of solids on the surface of the droplets. In the second section,  $\alpha$ -cyclodextrin was used as an emulsifier that forms the inclusion complex with oil molecules. We focused centrifuge precipitates in the oil in water type emulsion. From Raman spectra, centrifuged precipitates and absorbed at the surface of droplets showed similar spectra. From the PXRD, precipitates and original cyclodextrins showed different patterns. Therefore, the precipitate at the surface on the droplets derived from cyclodextrins and related to form the emulsions.

## 1. 緒言

一般にエマルションの調製には界面活性剤の使用が不可欠である。しかし、界面活性剤の種類によっては、人体に対して悪影響をおよぼすものや高い環境負荷のものもある。そのため、界面活性剤を使用しないサーファクタントフリーエマルションの開発が望まれている。シクロデキストリン(CD)はグルコースが $\alpha$ -1,4結合した環状オリゴ糖で内側に疎水部を有する。外側は親水性であるため高い水溶性をもち、疎水部の内洞が疎水性化合物を包接することにより包接複合体を形成する。CDと油分子が包接複合体を形成し、親水部を水相、疎水部を油相に吸着することで液滴を安定化するためエマルションを形成すると考えられてきた<sup>1)</sup>。しかしながら、液滴の安定化にはCD由来の析出物の析出が不可欠であるため、固体が油/水界面に析出することで形成されるPickeringエマルションであることがわかっている<sup>2)</sup>。これまでの検討では、エマルションの形成には固体の存在が不可欠であることはわかっているものの、油/水界面における固体の化学的な性質の直接的な解明はなされていない。本研究は、CDを乳化剤としたエマルションの実用化に向け、分光光学的手法を用いて基礎物性を明らかにすることを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1. 試薬

$\alpha$ および $\beta$ -CDは、日本食品化工(株)製のものを減圧乾燥(100℃, 12h)した。*n*-octane、*n*-dodecaneおよび*n*-hexadecaneは、関東化学(株)製の特級品をそのまま使用した。疎水化CDとしてheptakis(2, 3, 6-tri-O-propanoyl)- $\beta$ -CD(以下、TP- $\beta$ -CD)を選択し、Hirayamaらの方法に従い、 $\beta$ -CDをピリジン中で無水プロピオン酸と反応させることにより調製した<sup>3)</sup>。

### 2.2. エマルションの調製

所定量のCD、水および*n*-alkane類をホモジナイザー(10000rpm, 5分間)で攪拌しエマルションを調製した。25℃恒温下、1時間静置後の相状態を目視および光学顕微鏡観察し、三成分系状態図を作成した。なお、エマルションの型の判別は電気伝導度法および希釈法により行った。

### 2.3. 安定性試験および液滴粒子径の測定

バイアルに入れたエマルションを25℃恒温下にて静置し、経時的にエマルション相の高さを測定することで評価した。エマルションの粒子径は、エマルションの光学顕微鏡写真を元に、ImageJを用いて計測した。

### 2.4. クライオ走査型電子顕微鏡および偏光顕微鏡観察

エマルションの液滴表面の状態はクライオ走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した。エマルションを試料ステージに挟み込み、液体窒素中(-196℃)に突入させ急速凍結



Formation mechanism of surfactant-free emulsion stabilized by cyclodextrins

Motoki Inoue

Meiji Pharmaceutical University

させ物理的な固定を行った。ステージに挟み込まれた試料を、クライオユニット内で切断処理し、クライオSEM (JSM-6301F、日本電子(株)製)の加速電圧を12kVに設定し、断面を観察した。エマルションの液滴表面は偏光顕微鏡により観察した。

### 2. 5. エマルション中に生じた析出物の粉末X線回折 (PXRD) 測定

10000rpm、30minでエマルションを遠心分離した後、生じた析出物を減圧乾燥させ測定試料とした。試料をSi単結晶製の無反応試料プレートに充填し、粉末X線回折装置 (Miniflex、理学電機(株)製) Cu-k $\alpha$ 線 (30kV, 15mA)を用いて走査速度 4°/minで測定した。

### 2. 6. ラマンスペクトル測定

ラマン分光装置は光源波長 785nmレーザー、スペクトル分解能 4cm<sup>-1</sup>のWork Station™ (Kaiser Optical Systems)を用いた。なお、レーザー出力は400mW、露光時間は1sとした。

## 3. 結果

### 3. 1. エマルション液滴の安定性

疎水性CD誘導体であるTP- $\beta$ -CDを乳化剤としてエマルションを調整すると油中水 (W/O) 型となった。Figure 1はエマルションの経時変化を示す。この検討では、調製直後のW/O型エマルションの高さを100%とし、残存するエマルションの割合を百分率で表した。エマルション割合は7日後まで徐々に低下し、それ以降ほぼ一定値を示した。なお、この検討では連続相である*n*-alkaneのみの分離がみられた。その分離の傾向は鎖長により異なり、短いものはエマルションの安定性が低いことが明らかとなった。

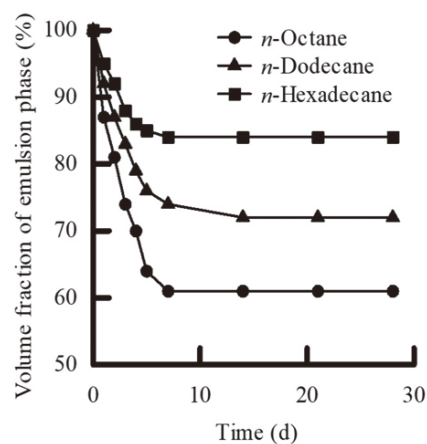


Figure 1 Volume fraction of the W/O emulsion phase for 4 weeks. Weight ratio of the emulsion is *n*-alkane/TP- $\beta$ -CD/water= 0.4/0.2/0.4.

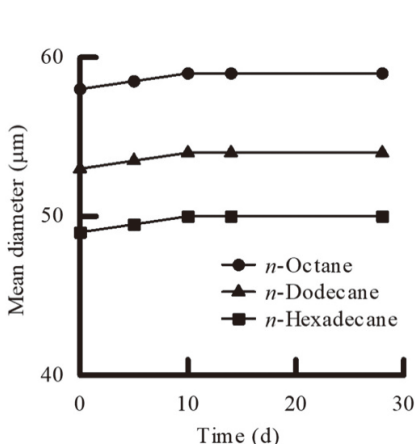


Figure 2 Time course of the water droplet size in the W/O emulsions. Weight ratio of the emulsion is *n*-alkane/TP- $\beta$ -CD/water= 0.4/0.2/0.4.

Figure 2はエマルション中液滴の粒子径の経時変化を示す。いずれの*n*-alkaneを用いた場合も直径50-60 $\mu$ mの液滴が確認された。その大きさは*n*-alkaneのアルキル鎖長によってわずかに異なり、*n*-octane>*n*-dodecane>*n*-hexadecaneの順に粒子径が大きかった。エマルションの不安定化に合一が認められず連続相の分離のみであることから、TP- $\beta$ -CDを用いたエマルションの不安定化は、主にクリーミングにより引き起こされることが明らかとなった。

### 3. 2. エマルション液滴表面の観察ならびに表面化学的特性

液滴断面を視覚的に明らかにするためにエマルションを凍結後に切断し、走査型電子顕微鏡 (SEM) で直接的に液滴表面を観察した。Figure 3は液滴表面のクライオSEM像を示す。液滴径は100 $\mu$ m程度で液滴表面の一部に卵殻状の析出物が吸着していることを確認した。このことより、TP- $\beta$ -CDを乳化剤として用いたエマルションは、油/水界面に吸着した析出物により安定化するものと考えられた。

エマルション中の析出物により油および水へのぬれ性が異なる理由について詳細に調べるため、表面自由エネルギー $\gamma_s$ を算出した。ここで、 $\gamma_s$ は分散力成分( $\gamma_s^d$ )と極性力成分( $\gamma_s^p$ )の2成分に大別され<sup>4,5)</sup>、2種の物質同士の各成分の値が近いほど物質間に相互作用が働きやすいといわれている。なお、析出物の $\gamma_s^d$ および $\gamma_s^p$ は、分散力成分および極性力成分が既知のプローブ液体を用いて接触角を測定し、以下のFowkesの式(式(1))により算出した。

$$\gamma_{SL} = \gamma_s + \gamma_L - 2\sqrt{\gamma_s^d \gamma_L^d} - 2\sqrt{\gamma_s^p \gamma_L^p} \quad (1)$$

ここで、 $\gamma_{SL}$ は液体と固体の界面張力、 $\gamma_L$ は液体の表面

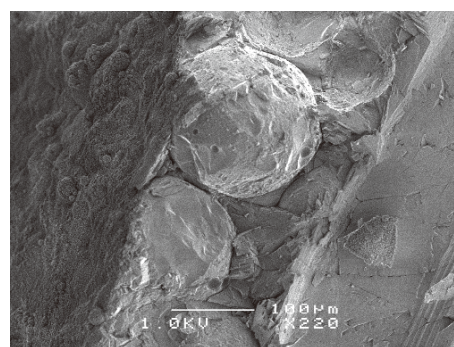


Figure 3 Cryo-SEM images of W/O emulsion. Weight ratio of the emulsion is *n*-alkane/TP- $\beta$ -CD/water= 0.4/0.2/0.4.

張力、 $\gamma_s^d$ および $\gamma_s^p$ はプローブとして用いた液体の表面張力の分散力成分および極性力成分である。Figure 4はTP- $\beta$ -CDを用いたエマルジョン中析出物の $\gamma_s^d$ および $\gamma_s^p$ の値を示す。 $n$ -alkaneの鎖長の増加に伴って析出物の $\gamma_s^p$ 値は減少し、 $\gamma_s^d$ は増加した。これはTP- $\beta$ -CD由来の析出物が $n$ -alkaneの影響を受け、分散力が高まり極性力が小さくなったと考えられる。

### 3. 3. エマルジョン中析出物の分光光学的な分析

油と包接化合物を形成しやすい $\alpha$ -CDを用い、 $n$ -alkaneエマルジョンについて検討を行った。 $\alpha$ -CD水溶液の上に $n$ -alkaneを積層すると油/水界面に目視で確認できる程度の白濁を確認した。Figure 5は $n$ -octane/水界面の偏光顕微鏡像であり、 $\alpha$ -CD由来不溶性析出物は複屈折を示した。

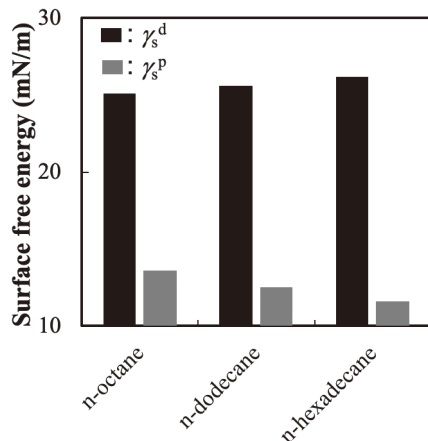


Figure 4 Dispersion force component ( $\gamma_s^d$ ), and polar force component ( $\gamma_s^p$ ) of precipitates in  $n$ -alkane/tripropanoyl  $\beta$ -CD/water systems at 25°C. The precipitates were centrifuged from the emulsion consisting  $n$ -alkane/TP- $\beta$ -CD/water = 0.4/0.2/0.4.

したがって、この析出物は結晶性の化合物であることがわかった。

ここで生じた析出物を採取し、ラマンスペクトルを測定した。Figure 6はエマルジョンを遠心分離により収集した析出物、 $n$ -octane/水界面に生じた析出物および原料である $\alpha$ -CDのラマンスペクトルを示す。 $\alpha$ -CDのスペクトルは複数のピークを有しており、特徴的な形状であった。一方、いずれの析出物のスペクトルにも $\alpha$ -CD由来のピークは確認されず、1350 $\text{cm}^{-1}$ 付近の幅広いピークのみが確認された。油/水界面に生じた析出物は $\alpha$ -CD結晶ではなくCDとオクタンによる包接複合体であることが推察された。

さらに結晶について詳細な検討を行うためエマルジョンを遠心分離して得られた析出物を乾燥し、PXRD測定した。いずれの析出物もCD単独のX線回折パターンとは異なる

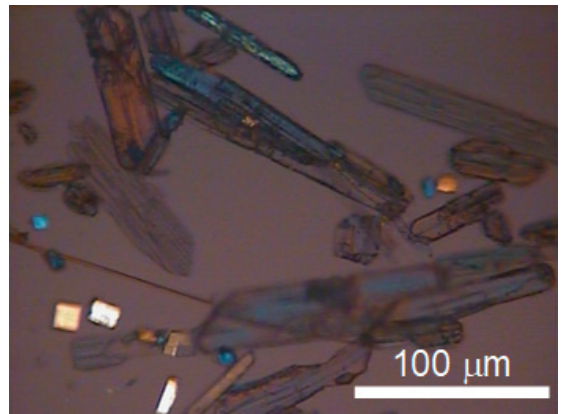


Figure 5 Polarized microscopic photographs of precipitates generated at the interface between  $n$ -octane and saturated  $\alpha$ -CD solution.

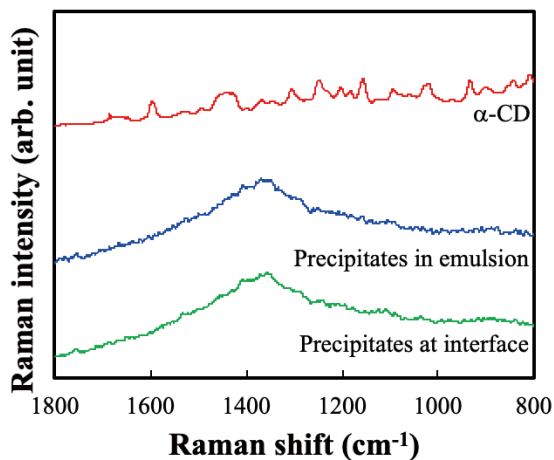


Figure 6 Raman spectra of precipitates and  $\alpha$ -CD. The precipitate generated at the interface between  $n$ -octane and saturated  $\alpha$ -CD solution and centrifuged from  $n$ -octane emulsion.

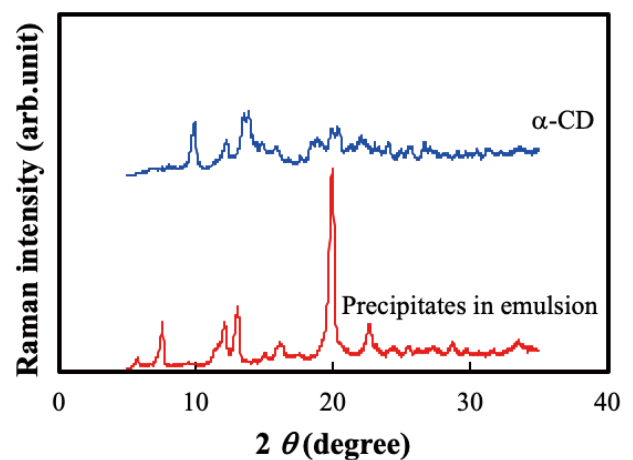


Figure 7 PXRD patterns of precipitates in emulsion and  $\alpha$ -CD. The composition of the emulsion is 0.4/0.08/0.52 ( $n$ -octane /  $\alpha$ -CD/water).

パターンを示したため、CD単独とは異なる結晶格子であることが示唆された。したがって、CDを用いたエマルション中の析出物はCD由来の包接錯体であることが確認された。したがって、シクロデキストリンを乳化剤としたエマルション形成には $\alpha$ -CD単独ではなく包接複合体の結晶による寄与が大きいことが示唆された (Figure 7)。

#### 4. 考 察

CDを乳化剤として用いたエマルションは界面活性剤を使用しないサーファクタントフリーエマルションであるため、近年、基礎研究のみならず実用化に関する研究も行われている。Pavnovらはこのエマルションを「Cyclodextrinosome」と名付け、水/油界面に吸着した不溶性の包接複合体についてSEMならびに色素を使った染色による詳細な検討を行っている<sup>6)</sup>。Lecleqらは抗真菌薬の基剤として応用するための検討を行い、従来の外用性基材と比較して遜色ないほど安定で、界面活性剤を乳化剤としたエマルションと比較して刺激も低いと報告している<sup>7)</sup>。CDを乳化剤としたエマルションは化粧品のみならず外用剤としても有用であることが期待されるにも関わらず、実用化には至っていない。それはエマルションを形成した際の析出物の物性が明らかになっていないためである。本研究では疎水化CDおよび天然のCDを用いて、CDを乳化剤としたエマルションの形成メカニズムを詳細に検討した。W/O型エマルションの不安定化を検討したところ、油相の分離が徐々に起こるものの水相の分離は起こらなかった。したがって、このエマルションの不安定化は合一ではなく、クリーミングにより引き起こされると推察された。液滴表面を観察したところ、油/水界面に析出物が見られPickeringエマルションであることが推察された。ZhangらはCDによるエマルションの形成は水/油界面張力の低下と不溶性複合体が形成するマイクロクリスタルによる水/油界面への吸着によるPickeringエマルションの形成の2つのメカニズムにより安定化すると報告し

た<sup>8)</sup>。しかしながら、Pickeringエマルションの場合、水と油の界面張力が大きいほど固体は油/水界面に吸着しやすくなる。ここで、仮にマイクロクリスタルがエマルション形成に関与していれば、析出物を取り除き、残った水相と油相を再び攪拌することで、液滴が形成されると考えた。フィルター (孔径 0.45 $\mu$ m) をろ過後、水相と油相を攪拌したが液滴の形成は見られなかった。したがって、本エマルションは主に固体が油/水界面に吸着することでエマルションを形成することが考えられた。析出物の油/水界面でのぬれ性を評価するため、固体の表面自由エネルギーを算出した。エマルション調製に用いた*n*-alkaneの鎖長の増加に伴い分散力が増加するものの、極性力は低下した。これは*n*-alkaneの物性の傾向と一致しており、析出物は用いた油相の種類に影響されることが推察された。次に、油分子と包接複合体を形成する $\alpha$ -CDを用いて油/水界面で形成される析出物の直接的な観察を行った。偏光顕微鏡による観察では、油/水界面に複屈折を示す析出物の吸着が見られた。この結晶をエマルション状態で化学的に検討するため、ラマンスペクトルを取得した。エマルション中から沈殿として得た析出物および油/水界面に生じた析出物のスペクトルを比較すると、油/水界面に生じた析出物は $\alpha$ -CD結晶ではなくCDとオクタンによる包接複合体であることが推察された。したがって、シクロデキストリンを乳化剤としたエマルション形成には $\alpha$ -CD単独ではなく包接複合体の結晶による寄与が大きいことが示唆された。CDを乳化剤として用いたエマルションはFigure 8に示すように固体微粒子が油/水界面に吸着して液滴を安定化すると考えられる。すなわち、油/水界面に吸着するあるいは析出し、液滴を覆い尽くすと、連続相に分散して3次元構造を形成する。塗布時に液滴の破壊が起こるため、油相を効果的に塗布ができるといった特徴があるため、クリーム性基剤として応用できる可能性がある。今後は析出物が生成する条件を検討することで、実用化に近づけると考えられる。

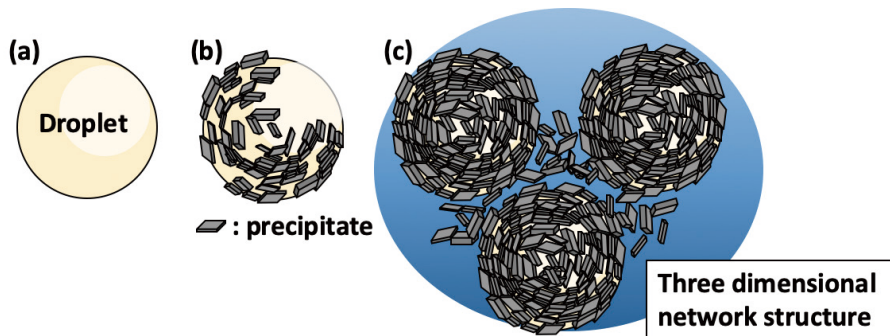


Figure 8 The formation mechanism of emulsion stabilized by cyclodextrins. (a) water or oil droplets, (b) precipitates generate and adsorb on the surface of droplets, (c) surface of the droplets were covered with generated precipitates and contributed to the formation of the three-dimensional network structure in the dispersed phase.

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

## (引用文献)

- 1) Kazuko, S.; Kimiko, K.; Junko, I.; Takashi, N. *Food Science* **1992**, *57*, 655-656.
- 2) Inoue, M.; Hashizaki, K.; Taguchi, H.; Saito, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 668-671.
- 3) Hirayama, F.; Yamanaka, M.; Horikawa, T.; Uekama, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 130-136.
- 4) Fowkes, F. M. *The Journal of Physical Chemistry* **1962**, *66*, 382-382.
- 5) Fowkes, F. M. *Industrial & Engineering Chemistry* **1964**, *56*, 40-52.
- 6) Mathapa, B. G.; Paunov, V. N. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15*, 17903-17914.
- 7) Leclercq, L.; Nardello-Rataj, V. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *82*, 126-137.
- 8) Li, X.; Li, H.; Xiao, Q.; Wang, L.; Wang, M.; Lu, X.; York, P.; Shi, S.; Zhang, J. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2014**, *16*, 14059-14069.