NMR 及び Cryo-TEM 併用によるエマルション中の化粧品原料の分散・溶解状態の定量的評価基盤の確立

千葉大学大学院薬学研究院

植田　圭祐

This study aimed to investigate the effect of different types of oil used in emulsions on the supersaturated dissolution behavior and liquid-liquid phase separation (LLPS) of active ingredients. Labrafil® M 1944 CS (M1944, hydrophilic-lipophilic balance (HLB): 9.0) and LabrafacTM PG (PG, HLB: 1.0) were used as oils with different hydrophobicity. Fenofibrate (FFB) was used as a model active ingredient that is poorly water-soluble. Cryo-TEM observations showed emulsion droplets less than 20 nm in diameter and FFB-rich droplets ranging from several tens nm to over 100 nm in diameter in each emulsion. ^{1}H NMR analysis indicated that M1944 had minimal impact on the molecular environment of the FFB-rich phase. In contrast, the distribution of PG into the FFB-rich phase in the PG emulsion changed the molecular environment of the FFB-rich phase. This change reduced the chemical potential of the FFB-rich phase and, consequently, the FFB concentration dissolved in the bulk water. The present study clarified that LLPS of FFB occurs even in emulsions, forming the FFB-rich phase. The LLPS behavior of FFB varied depending on the type of oil used in the emulsion. Highly hydrophobic PG was liable to partition into the hydrophobic active ingredient-rich phase and reduce the concentration of the active ingredient dissolved in the bulk water. To improve the absorption of active ingredients in supersaturation-forming emulsion formulations, it is important to consider the effect of emulsion components on the LLPS of the active ingredient.

1．緒　言

エマルションは化粧品や医薬品有効成分の吸収性や使用感の向上等を目的として、様々な用途に用いられている。近年では脂質製剤の一種である自己乳化型マイクロエマルション製剤（SMEDDS製剤: Self-microemulsifying drug delivery system）が広く研究されている。SMEDDS製剤はoil、surfactant、co-surfactantで構成される脂質製剤であり、水との接触により自己乳化し、マイクロエマルション（Microemulsion, ME）を形成する[1-2]。MEは一般的なエマルションのように水やoil等の2種類の液体を含む一方、oilが直径100 nm以下の膨潤ミセルとして水溶液に分散した熱力学的に安定な分散系である。ナノサイズ化による液滴の表面積の増大により、有効成分が効率的に水中に放出される。このような利点から難溶性成分の吸収性改善においてSMEDDS製剤の有用性が示されている。また、近年では過飽和形成型のSMEDDS製剤が有効成分の更なる吸収改善を目的として研究されている[3]。過飽和形成型のSMEDDS製剤ではバルクの水中に溶解した有効成分濃度が結晶溶解度以上に到達しており、受動拡散による吸収を効果的に改善する。

エマルションからの有効成分の吸収は、一般的にエマルション構成成分と適応部位の相性や、エマルション構成成分と有効成分の相溶性等によって変化する。しかし、有効成分の吸収性を最大化するためのエマルション設計指針は未だ確立されておらず、製品開発は依然トライ＆エラーの状況である。これはエマルション中における、有効成分の分子状態について十分な評価基盤が確立されていないためである。例えば、水中油（O/W）型のエマルションを例に挙げると、有効成分は水相及び油相中に分配することに加えて、界面活性剤により形成されたミセル中にも分配する。過飽和形成型の製剤において有効成分濃度が非晶質溶解度に達すると、有効成分は単分子状態でバルクの水中に溶解することができずに水相と有効成分濃縮相に相分離を起こすことが報告されている。この現象は液―液相分離（LLPS）と呼ばれる[4]。有効成分濃縮相は有効成分のリザーバーとして機能する一方、バルクの水中に溶解した有効成分濃度は非晶質溶解度で維持されるため、過飽和形成による吸収性向上はLLPSにより制限される[5]。エマルション中でも同様に有効成分濃度がある一定の濃度以上になるとバルクの水相から有効成分がLLPSを起こすと考えられるが、oilを含むエマルションにおける有効成分のLLPS現象については十分な研究が行われていない。

そこで本研究では、SMEDDS製剤構成成分が有効成分の過飽和溶解挙動に及ぼす影響の評価を目的として、核磁気共鳴法（NMR）及び極低温透過型電子顕微鏡（cryo-TEM）を組み合わせた、エマルション中の有効成分の分散・溶解状態の定量的評価技術確立を目的とした検討を行った。

Development of quantitative evaluation methodology of cosmetic ingredients in emulsions by combined use of NMR and Cryo-TEM

Keisuke Ueda

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

2．方　法

2．1．試料調製

Oil として疎水性の異なる Labrafil® M 1944 CS（M1944, Hydrophilic-Lipophilic Balance(HLB)＝9.0）及び LabrafacTM PG（PG, HLB=1.0）を用いた。Surfactant として NIKKOL HCO-40(HCO40, HLB=12.5）及び co-surfactant として Transcutol® P をそれぞれ用いた。Oil, surfactant, co-surfactant を秤量し、40℃にて混合することにより SMEDDS 製剤を得た。調製した SMEDDS 製剤に対して難水溶性モデル有効成分として Fenofibrate（FFB）を加え、完全に溶解させることで FFB 封入 SMEDDS 製剤を調製した。FFB 未封入 SMEDDS 製剤及び FFB 封入 SMEDDS 製剤を PBS に分散させることにより ME を調製した。同様の調製法により、oil を含まない HCO40 ミセル溶液及び oil、surfactant を含まない blank 溶液も調製した。調製した各試料の組成を Table 1 に示す。

Table 1 Composition of samples（unit: g）. FFB dose in FFB-loaded samples represents in parentheses.

Sample		SMEDDS components					PBS
		M1944	PG	HCO40	Transcutol® P	FFB	
Blank solution		-	-	-	1	(0.1)	100
Micellar solution		-	-	0.2	1	(0.1)	100
M1944 ME	M1944 ME (oil 0.01)	0.01	-	0.2	1	(0.1)	100
	M1944 ME (oil 0.02)	0.02	-	0.2	1	(0.1)	100
	M1944 ME (oil 0.03)	0.03	-	0.2	1	(0.1)	100
	M1944 ME (oil 0.05)	0.05	-	0.2	1	(0.1)	100
	M1944 ME (oil 0.1)	0.1	-	0.2	1	(0.1)	100
PG ME	PG ME (oil 0.01)	-	0.01	0.2	1	(0.1)	100
	PG ME (oil 0.02)	-	0.02	0.2	1	(0.1)	100
	PG ME (oil 0.03)	-	0.03	0.2	1	(0.1)	100
	PG ME (oil 0.05)	-	0.05	0.2	1	(0.1)	100
	PG ME (oil 0.1)	-	0.1	0.2	1	(0.1)	100

2．2．Cryo-TEM測定

JEM-2100Fを用いて、加速電圧120kVでcryo-TEM測定を行った。

2．3．溶液 ^{1}H NMR測定

JNM-ECZ600（14.1 T）を用いて ^{1}H NMR測定を行った。DANTE presaturationによる水消しを用い、37℃において ^{1}H NMRスペクトルを取得した。

3．結 果

3．1．Cryo-TEMによるFFB封入MEの形態評価

M1944 ME（oil 0.01）及びM1944 ME（oil 0.02）では、直径約20 nmの膨潤ミセル由来の液滴に加えて直径150nm程度の大きな粒子が観察され（Fig. 1）、FFB濃縮相の形成が示された。また、FFB封入M1944 ME（oil 0.03）では20 nm程度の膨潤ミセルに加えて100 nm程度のFFB濃縮相液滴と考えられる粒子が観察された。一方、M1944 ME（oil 0.05）及びM1944 ME（oil 0.1）では、直径20 nm程度の膨潤ミセルのみが観察された。これらの結果から、M1944 ME（oil 0.05）及びM1944 ME（oil 0.1）中では仕込みFFBすべてが膨潤ミセル中に可溶化され、FFB濃縮相が形成されなかったと考察した。すなわち、これらの溶液中における見かけのFFB非晶質溶解度はFFB仕込み濃度（1000 μg/mL）以上であることが示唆された。

FFB封入PG MEについてcryo-TEM測定を行った結果、直径10～20 nm程度の膨潤ミセルに加えて直径約50～100 nm程度の粒子が観察され（Fig. 2）、FFB濃縮相液滴の形成が示唆された。加えて、PG濃度が最も高いPG ME（oil 0.1）のcryo-TEM画像中においてもFFB濃縮相に由来する液滴が認められたことから、今回調製したすべてのPG MEにおいて、見かけのFFB非晶質溶解度はFFB仕込み濃度（1000 μg/mL）以下であることが示唆された。更に、PG含量の増加に伴いFFB濃縮相液滴のサイズが小さくなったことから、PGの共存がFFB濃縮相液滴サイズに影響を及ぼすことが認められた。

3．2．^{1}H NMR測定による分子状態評価

Fig. 3にはFFB封入M1944 MEの ^{1}H NMRスペクトルにおけるFFBの芳香環プロトン部分の拡大図を示す。M1944濃度が0.03％以下のFFB含有M1944 MEのNMRスペクトルにおいては、水相に溶解したFFB及びFFB濃縮相に由来するピークがそれぞれ認められ、FFBがM1944 ME中においてFFB濃縮相を形成したことが示された。波形分離により得られた各相のFFBのピークの面積値から水相及びFFB濃縮相中に存在するFFB量を算出した（Fig. 4a）。M1944含量の増加に伴い水相中のFFB濃度が増加し、FFB濃縮相量が減少した。この結果から、FFB濃縮相存在下におけるME中のFFB濃度、すなわち見かけの非晶質溶解度はM1944の増加に応じて増加することが示された。また、M1944濃度が0.05％以上のM1944 MEでは溶解FFB濃度が仕込みFFB濃度と同様の値となり、すべてのFFBがME中に溶解した状態であることが確認された。

FFB濃縮相中に由来するFFBピークのケミカルシフトはM1944濃度に依存せず一定であった（Fig. 3）。更に、

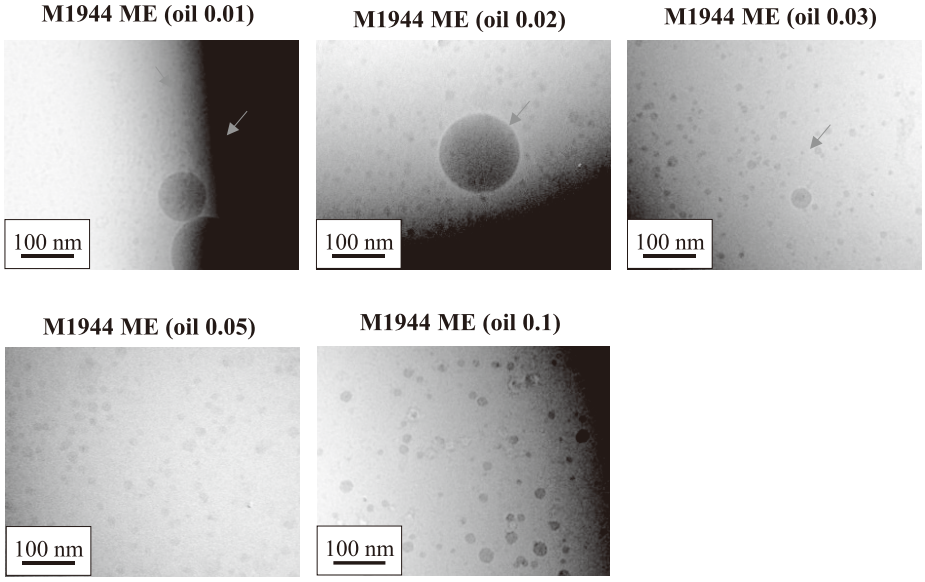

Fig. 1 Cryo-TEM images of FFB-loaded M1944 ME. The arrows indicate FFB-rich phases.

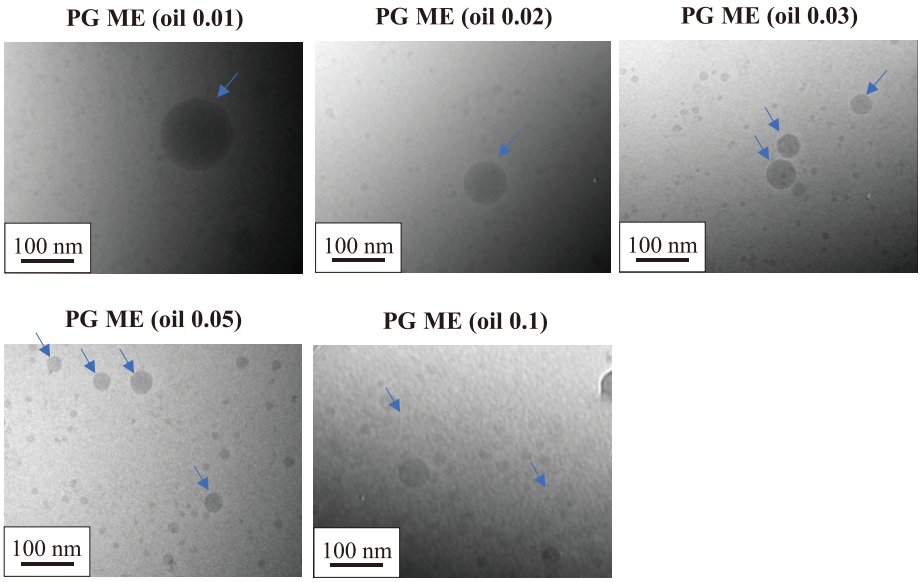

Fig. 2 Cryo-TEM images of FFB-loaded PG ME. The arrows indicate FFB-rich phases.

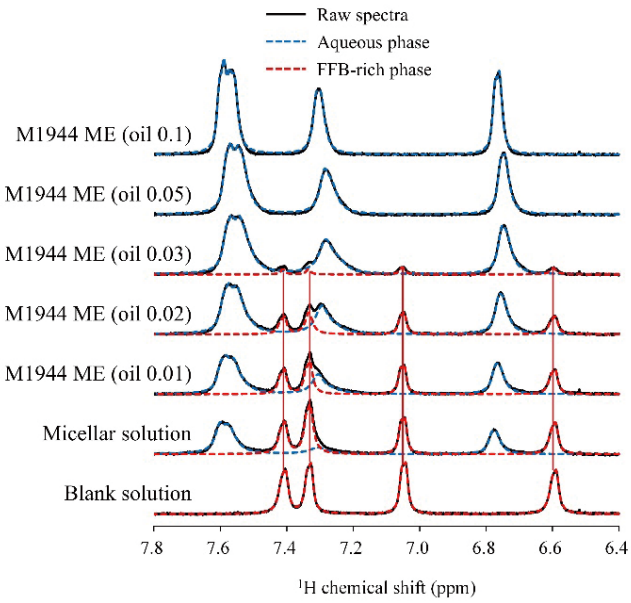

Fig. 3 ^{1}H NMR spectra of aromatic region of FFB in FFB-loaded M1944 ME.

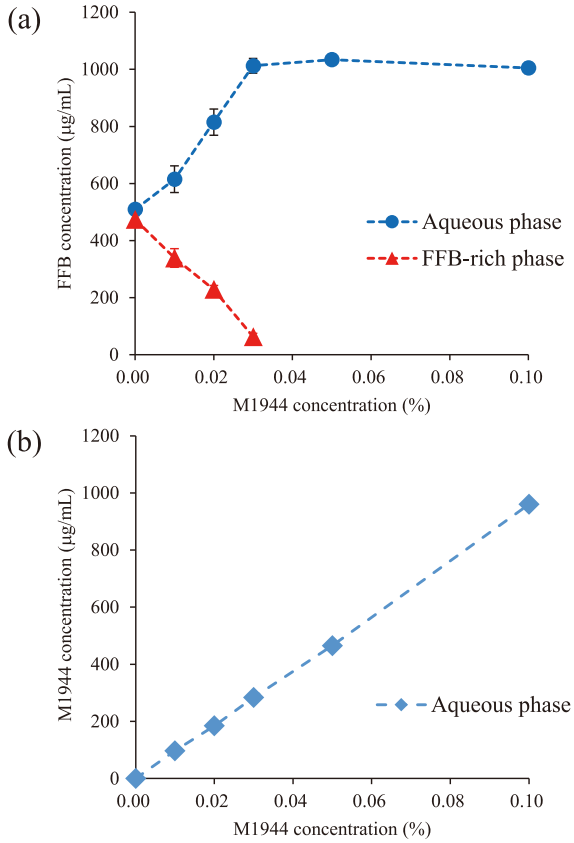

Fig. 4 (a) Dissolved FFB in aqueous phase and phase-separated FFB concentrations calculated by the FFB peak area. (b) M1944 concentration in aqueous phase.

NMRスペクトルにおいて認められたM1944ピークの面積値から算出したFFB封入M1944 MEの水相に存在するM1944量は仕込みM1944量と一致しており、ほぼすべてのM1944が水相に存在することが確認された（Fig. 4b）。以上の結果から、M1944の添加はFFB濃縮相中のFFBの分子環境に影響を及ぼさないことが示された。

Fig. 5にFFB含有PG MEの^{1}H NMRスペクトルにおけるFFBの芳香環プロトン部分の拡大図を示す。PG濃度が0.05%以下のPG MEにおいては、溶解FFBに由来するピーク及びFFB濃縮相に由来するピークがそれぞれ認められた。一方、PG含量の増加に伴い、FFB濃縮相に由来するピークが低磁場シフトし、PG ME（oil 0.1）のスペクトルにおいては各相のFFBピークの波形分離が行えな

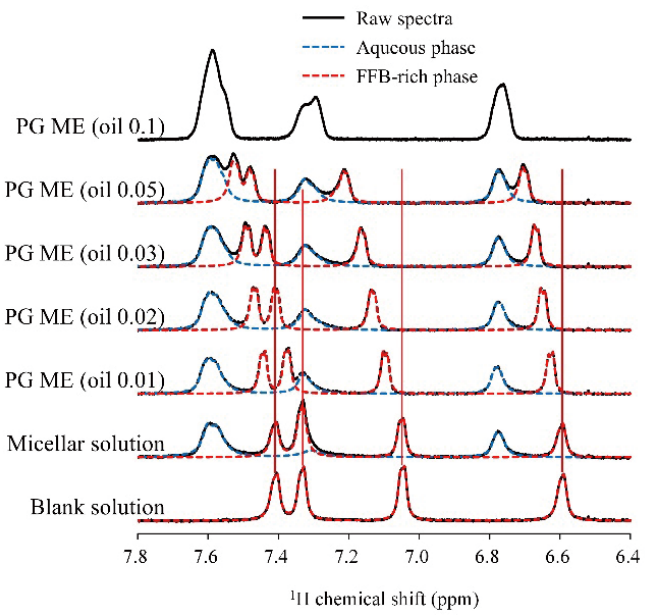

Fig. 5 ^{1}H NMR spectra of aromatic region of FFB in FFB-loaded PG ME.

かった。しかし、cryo-TEMを用いた解析より、FFB含有PG ME (oil 0.1) 中においてもFFB濃縮相の形成が示されていることから、PG ME (oil 0.1) のNMRスペクトル中ではFFB濃縮相に由来するピークが水相に溶解したFFBピークと重なっていると考察した。Fig. 6a には波形分離により得られたピークの面積値より算出した水相及びFFB濃縮相中のFFB量を示す。水相及びFFB濃縮相中のFFB量はPG仕込み量を変化させてもほとんど一定であった。この結果から、FFB濃縮相存在下における水相中のFFB濃度、すなわち見かけの非晶質溶解度はPG濃度にかかわらずほぼ一定であることが示唆された。

先にも述べたようにFFB濃縮相に由来するFFBピークはPG量の増加に伴い大きく低磁場シフトした (Fig. 5)。また、NMR測定結果の解析から、一部のPGがFFB濃縮相に分配していることが示されており、PGの混合によりFFB濃縮相の分子環境が変化したことが示された。NMRスペクトル上のPGピークの面積値から水相及びFFB濃縮相中のPG量を算出した結果 (Fig. 6b)、水相及びFFB濃縮相に存在するPG量は共にPG含量の増加に伴って増加した。FFB濃縮相量及びFFB濃縮相中に分配したPG量からFFB濃縮相中のFFBに対するPGの質量比を算出した結果 (Fig. 6c)、PG仕込み量の増加に伴い、FFB濃縮相中のPG比率が増加することが示された。従って、PG仕込み量の増加に伴うFFB濃縮相へのPG分配量の増加によりFFB濃縮相の分子環境がより大きく変化し、FFB濃縮相中のFFBピークがより低磁場側へシフトしたと考察した。

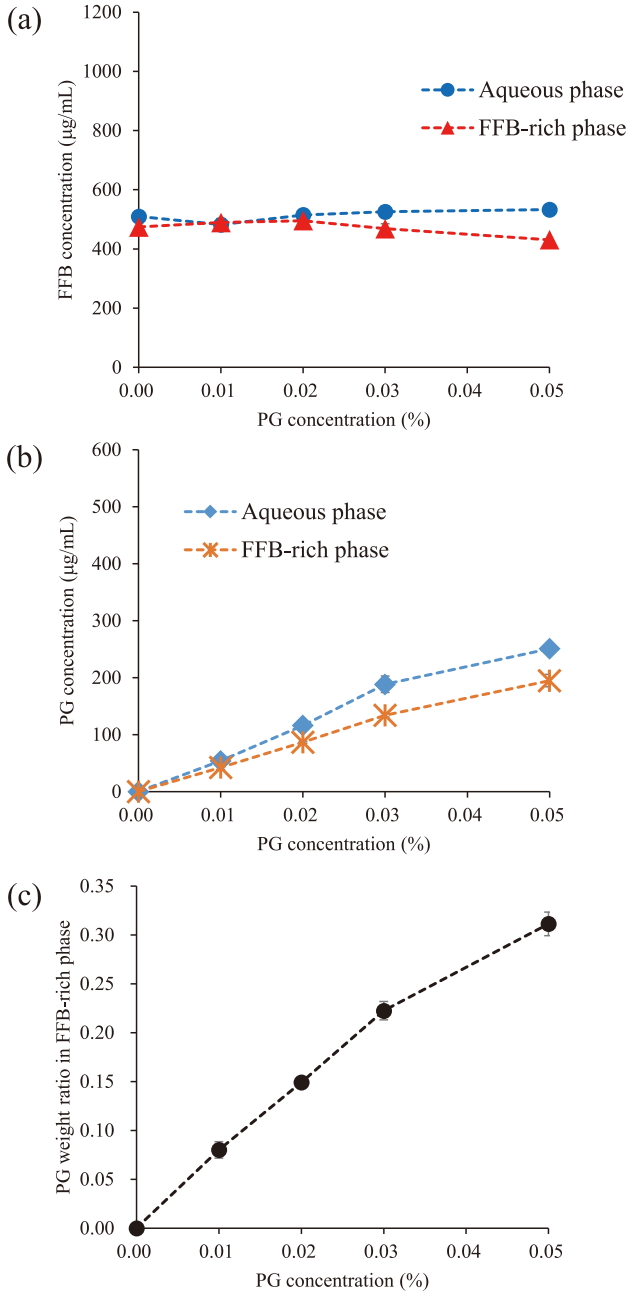

Fig. 6 (a) Dissolved FFB in aqueous phase and phase-separated FFB concentrations calculated by the FFB peak area. (b) PG concentration in aqueous phase. (c) Weight ratio of PG to FFB in FFB-rich phase (n=3, mean ± S.D.).

4. 考　察

Fig. 7には各ME中におけるFFB分散状態の模式図を示す。M1944 ME中ではM1944濃度の増加に伴い可溶化されるFFB量が増加し、見かけのFFB非晶質溶解度が上昇した。一方、NMR測定結果より、FFB濃縮相の分子環境はM1944の共存により変化しないことが示された。以上の結果から、M1944 ME中のバルクの水中の最大FFB濃度はFFB本来の非晶質溶解度(~4.5 μg/mL)で一定となり、

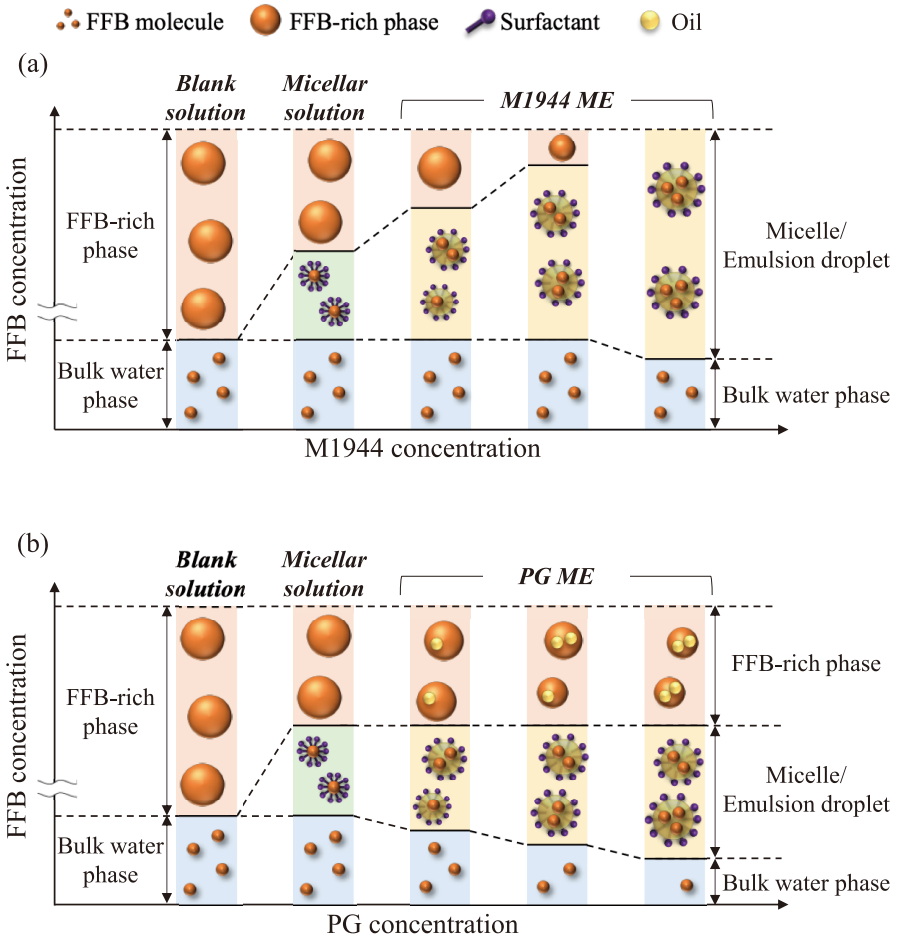

Fig. 7 Schematic illustration of FFB dissolved state in (a) M1944 ME and (b) PG ME.

FFB濃縮相の形成が認められたM1944濃度範囲では膨潤ミセルに可溶化された分だけ溶解有効成分濃度（＝見かけの非晶質溶解度）が上昇したと考察した。一方、M1944濃度0.05％以上のME試料ではFFB濃縮相が形成されておらず、本試験で用いたFFB仕込み濃度（1000 μg/mL）がME中における見かけの非晶質溶解度に到達していないことが示された。

一方、PG MEではPG含量にかかわらず、水相に溶解したFFB量がほとんど変化せず、すべての系においてFFB濃縮相形成が認められた。M1944 MEと比較してPG MEはFFBの可溶化作用が弱いことが示されている一方、ミセル溶液と比較してPG ME（oil 0.1）中においてFFB溶解度が改善していることが示されており、少なくともPG添加によりFFB可溶化作用は強くなっていると推察される。一方、FFB封入PG MEのNMR解析より、PGはFFB濃縮相に分配することが示されている。有効成分濃縮相への添加剤成分の分配は有効成分濃縮相中の有効成分の化学ポテンシャルを低下させ、有効成分濃縮相と平衡状態にあるバルクの水中にフリーで溶解する有効成分濃度を減少させることが報告されている[6-7]。PG MEではPG含量の増加に伴いFFB濃縮相中に分配したPG量が増加し、バルクの水中に溶解可能な最大FFB濃度が減少したと考えられた。PG濃度依存的にバルクの水中に溶解したFFB濃度が低下した結果、膨潤ミセルによる可溶化作用がPG濃度依存的に増加したにもかかわらず、見かけのFFB非晶質溶解度がPG ME中において一定になったと考察した。

5．総　括

NMRを用いた解析によりME中に用いるoilが有効成分の過飽和溶解挙動に大きな影響を及ぼすことが示された。M1944の添加はFFBのバルクの水中における過飽和度を低下させるリスクは小さかった一方、M1944濃度が高い場合、M1944の強いFFB可溶化能力によって、バルクの水中におけるFFB過飽和度は低下することが示された。一方、PGの添加はPGのFFB濃縮相中への分配によりFFBの到達可能な最大過飽和度を直接的に低下させた。このようにエマルション中のオイルは有効成分の過飽和溶解挙動やLLPS挙動に大きな影響を及ぼし、分子状態評価に基づく最適なエマルション組成選択が、MEを活用した吸収改善において重要であると考えられた。本研究より、

エマルション中の有効成分の分散状態の定量的評価におけるNMRの有用性が示された。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、ご援助を賜り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深く感謝申し上げます。

（引用文献）

1）C. W. Pouton Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **25**（**1**）, 47-58, 1997.

2）R. Neslihan Gursoy, S. Benita Self-emulsifying drug delivery systems（SEDDS）for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed. Pharmacother.* **58**（**3**）, 173-182, 2004.

3）H. D. Williams, N. L. Trevaskis, Y. Y. Yeap, M. U. Anby, C. W. Pouton, C. J. H. Porter Lipid-based formulations and drug supersaturation: harnessing the unique benefits of the lipid digestion/absorption pathway. *Pharm. Res.* **30**（**12**）, 2976-2992, 2013.

4）G. A.Ilevbare, L. S. Taylor Liquid-liquid phase separation in highly supersaturated aqueous solutions of poorly water-soluble drugs: Implications for solubility enhancing formulations. *Cryst. Growth Des.* **13**（**4**）, 1497-1509, 2013.

5）A. S. Indulkar, Y. Gao, S. A. Raina, G. G. Z. Zhang, L. S. Taylor Exploiting the phenomenon of liquid-liquid phase separation for enhanced and sustained membrane transport of a poorly water-soluble drug. *Mol. Pharm.* **13**（**6**）, 2059-2069, 2016.

6）K. Ueda, D. E. Moseson, V. Pathak, L. S. Taylor Effect of polymer species on maximum aqueous phase supersaturation revealed by quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Mol. Pharm.* **18**（**3**）, 1344-1355, 2021.

7）N. S. Trasi, L. S.Taylor Thermodynamics of highly supersaturated aqueous solutions of poorly water-soluble drugs—Impact of a second drug on the solution phase behavior and implications for combination products. *J. Pharm. Sci.* **104**（**8**）, 2583-2593, 2015.