卵黄レシチン・リゾレシチン混合系により低温で調製したナノエマルジョンの安定性

東京海洋大学食品生産科学部門・教授　松川　真吾

■　緒　言

卵黄レシチンとリゾレシチンの混合溶液を加熱するとひも状ミセルを形成し、これを乳化剤として用いると低温でナノエマルジョン(以下、nanoEm)を調製することができる[1,2]。これは形の異なる2種類の分子が混在した界面を作ることでエマルジョン化に必要な活性化エネルギーを低下できるからと考えられるが、一方で乳化された油滴が容易に合一化してしまう可能性を示している。しかし、nanoEmの合一安定性の評価は容易ではなく、確立した精度の高い定量的評価法はない。

本研究では申請者が食品物性の評価手法として行ってきた蛍光粒子追跡法、NMRによる核オーバーハウザー効果(NOE)の測定を応用して、nanoEmの合一化過程を詳細に評価する方法を確立し、それを混合レシチン系による低温調製nanoEmの加工プロセスおよび保存中の合一安定性評価に応用することを目的とする。

蛍光顕微鏡による粒子合一化の定量に用いる試料には油溶性カルボシアニン色素DiI(赤)とDiO(緑)を添加した油成分を用いる。DiIまたはDiOを含むエマルジョンを調製し、それらを混合した後に粒子内の赤色蛍光強度と緑色蛍光強度を測定する。混合中に合一が起きた場合、粒子内にはDiIとDiOが混在するため、赤色蛍光と緑色蛍光の蛍光強度比から混合中の合一安定性を評価することができる。

NMR測定では、スクワランのピークとスクワレンのピークの間のNOEによる交差ピークを測定する。交差ピークの出現は合一による分子レベルでの混合を示すため、混合中の合一安定性を評価することができる。

これらの安定性評価法は食品産業分野では、ストレスのかかる加工プロセスや長期保存によるnanoEmの合一化を予測する有用な手段を提供する。また、医療分野では混合できない薬剤のそれぞれのnanoEmを混合した場合の合一化による薬剤の混合の危険性を評価する手法となると期待される。

■　方　法

1. 蛍光色素を用いたナノエマルジョン安定性評価法の検討

0.05%の蛍光色素(DiIまたはDiO)を含んだ油相(スクアレン80%, リノール酸20%)5%(w/w)を64mM Tween60の水溶液に分散させ、高速分散ハイシアーミキサー(Silverson L5M-A, Buckinghamshire, England)を用いて、10,000rpmで40℃、2分間乳化し粗エマルジョンを調製した。得られた粗エマルジョンを、マイクロフルイダイザー(microfluidizer LV-1-UR, Microfluidics, USA)により、10,000psiで一回乳化することでnanoEmを得た。

調製したDiI含有nanoEmとDiO含有nanoEmをマイクロフルイダイザーを用いて室温下または60℃加熱下で混合し、調製した混合nanoEmを分子量4,000,000ポリエチレングリコール(PEG)2%溶液で500倍希釈をした後、蛍光顕微鏡(HS All-in-one Fluorescence Microscope BZ-9000E, KEYENCE, Japan)を用いて観察した。

蛍光顕微鏡観察によって得られた結果をMathematica12で自作したプログラムを用いて画像解析した。画像解析には画素数1360×1024の画像を使用した。画像内のエマルジョンを検知し、それぞれのエマルジョン内の赤色蛍光と緑色蛍光の最大蛍光強度を測定した。エマルジョン内の赤色蛍光強度を緑色蛍光強度と赤色蛍光強度の合計で割ることで混合割合を算出した。混合割合が1に近づくほど赤色蛍光の割合が多くなり、0に近づくほど緑色蛍光の割合が多くなる。そして、蛍光色素の混合比の存在割合から安定性の評価を行い、本安定性評価法について検討した。

2. 卵黄レシチンとリゾレシチンを用いたナノエマルジョンの安定性評価

1の安定性評価法を用いて卵黄レシチンとリゾレシチンを用いて調製したnanoEmの安定性評価を行った。

nanoEmの油相には0.05%の蛍光色素(DiIまたはDiO)を含んだ大豆油を使用し、水相には64mM

PC 溶液、64mM LPC 溶液、64mM 混合 LPC/PC ミセル溶液(LPC/PC＝42/22)を使用した。混合 LPC/PC ミセル溶液は加熱と冷却によってひも状ミセルを形成させた。蛍光色素を含んだ 5%(w/w)の大豆油をそれぞれの界面活性剤溶液に分散させ、高速分散ハイシアーミキサーを用いて、10,000rpm で 40℃、2 分間乳化し粗エマルジョンを調製した。得られた粗エマルジョンを、マイクロフルイダイザーにより、10,000psi で一回乳化することで nanoEm を得た。調製した DiI 含有 nanoEm と DiO 含有 nanoEm をボルテックスミキサーまたは高速分散ハイシアーミキサー用いて室温下で混合し、調製した混合 nanoEm を分子量 4,000,000PEG 2%溶液で 500 倍希釈した。また、PEG 溶液内で DiI 含有 nanoEm と DiO 含有 nanoEm を混合したサンプル、PEG 溶液で希釈した DiI 含有 nanoEm と DiO 含有 nanoEm を緩やかに混合したサンプルを調製した。調製したサンプルを蛍光顕微鏡で観察し、1 と同様の方法で画像解析を行い、蛍光色素の混合比の存在割合からエマルジョンの安定性評価を行った。

3．NOE 測定による安定性評価

スクアランとスクアレンの間の NOE を確認するために、それぞれを 50:50 で混合して測定試料を調製し、600MHzNMR 装置(Bruker Ascend 600、Bruker)を用いて事前飽和法によって測定した。

■ 結 果

1．蛍光色素を用いたナノエマルジョン安定性評価法の検討

DiI または DiO を含む nanoEm をそれぞれ調製した後に各種条件で混合した。室温下、64mM の Tween60 を界面活性剤に使用したエマルジョンにおいてマイクロフルイダイザーでそれぞれ混合した結果、蛍光強度の混合比が 0 と 0.9 付近の nanoEm が多く存在していた(図 1)。混合比が 1 ではなく 0.9 付近の nanoEm が多かったのは緑色蛍光のノイズが影響しているためだと考えられる。蛍光強度の混合比の結果から顕著な合一は確認されず、これらの混合条件化においては安定していると評価された。

しかし、60℃で加熱しながら混合した場合、蛍光強度の混合比は 0.5 付近にも多く存在した(図 2)。そのため、混合中に合一が起きたことが確認され加熱条件化におけるは混合操作中の nanoEm は不安定であると評価された。これらの結果から、本評価方法は各種の nanoEm の安定性評価において有用であると示唆された。

2．卵黄レシチンとリゾレシチンを用いたナノエマルジョンの安定性評価

DiI または DiO を含むエマルジョンをそれぞれ調製した後に各種条件で混合した。PC, LPC, 混合 LPC/PC ミセル溶液をそれぞれ用いたエマルジョン全てにおいて PEG 溶液内で緩やかに混合したサンプル以外は蛍光強度の混合比が 0.5 付近に多く存在したため、混合中に合一が起きており不安定であると評価された(図 3, 4, 5)。

3．NOE 測定による安定性評価

図 6 にスクアランとスクアレンの混合試料のスペクトルをしました。下段はピークの無い 4ppm(図中矢印)に事前飽和照射を行った対照スペクトルであり、NOE の影響を受けずにすべてのピークが現れている。a の添え字のあるピークがスクアラン由来であり、e の添え字のあるピークがスクワレン由来である。中段には 5.27ppm(図中矢印)のスクアレン由来のピークに対して事前飽和を行った場合、上段には 1.04ppm(図中矢印)のスクアラン由来のピークに対して事前飽和を行った場合の対照スペクトルとの差スペクトルを示した。いずれの差スペクトルにおいても、僅かに分子内の NOE によるピークの増大が見られたが、分子間の NOE によるピーク強度の変化は見られなかった。

■ 考 察

1．蛍光色素を用いたナノエマルジョン安定性評価法の検討

DiI または DiO を含むエマルジョンをそれぞれ調製した後に各種条件で混合した結果、室温下で混合した場合エマルジョンは安定を保っていた。Tween60 がもつ大きなヘッドグループによる立体反発作用が油滴同士の合一を妨げていたため、エマルジョンは混合中も安定していたと考えられる。

しかし、60℃加熱下で混合した場合不安定となった。Tween60 はポリエチレンオキシド鎖を分子内に含むことで親水性を得ている。ポリエチレンオキシド鎖の高い水溶解度は、溶媒と鎖内のエーテル酸素原子との間の水素結合によるものであるため、温度が高くなるにつれて親水基部分の水和度が減少していき、不安定化されたと考えられる。そのため、60℃加熱下における混合によってエマル

ジョンが合一したと考えられる。

2. 卵黄レシチンとリゾレシチンを用いたナノエマルジョンの安定性評価

DiI または DiO を含むエマルジョンをそれぞれ調製した後に各種条件で混合した結果、PEG 溶液内で緩やかに混合したサンプル以外は混合中に顕著な合一が確認された。Tween60 に比べ PC, LPC, 混合 LPC/PC ミセル溶液を用いたエマルジョンはクリーミングが早く発生し始めるため不安定である。そのため、混合した場合においても顕著な合一が確認され、不安定であると評価されたと考えられる。

3. NOE 測定による安定性評価

スクアランとスクアレンの混合試料においても分子間の NOE は見られなかったことから、個別に調製したスクアラン及びスクアレンの nonoEm の合一化を評価することは難しいと考えられる。

■ 要 約

蛍光色素を使うことで混合中のエマルジョンの安定性の評価が可能であるとが示された。PC,LPC を用いて調製されたエマルジョンは混合操作中に合一が発生しており、機械的なストレスに対して不安定であると評価された。

■ 文 献

1) N. Fafaungwithayakul, U. Klinkesorn, T. Brenner, N. Vichakacharu, S. Matsukawa (2014), Thermally inducedgelation of mixed phosphatidylcholine aqueous solution containing wormlike micelle structure, *Japan J. of Food Engineering,* 15, 233-242.

2) P. Nantarajit, N. Fafaungwithayakul, N. Vichakacharu, S. Matsukawa (2018), Rheological properties in solutions of wormlike micelle composed of lysophosphatidylcholine/phosphatidylcholine mixture, *Journal of Biorheology,* 31 (2) 44-49

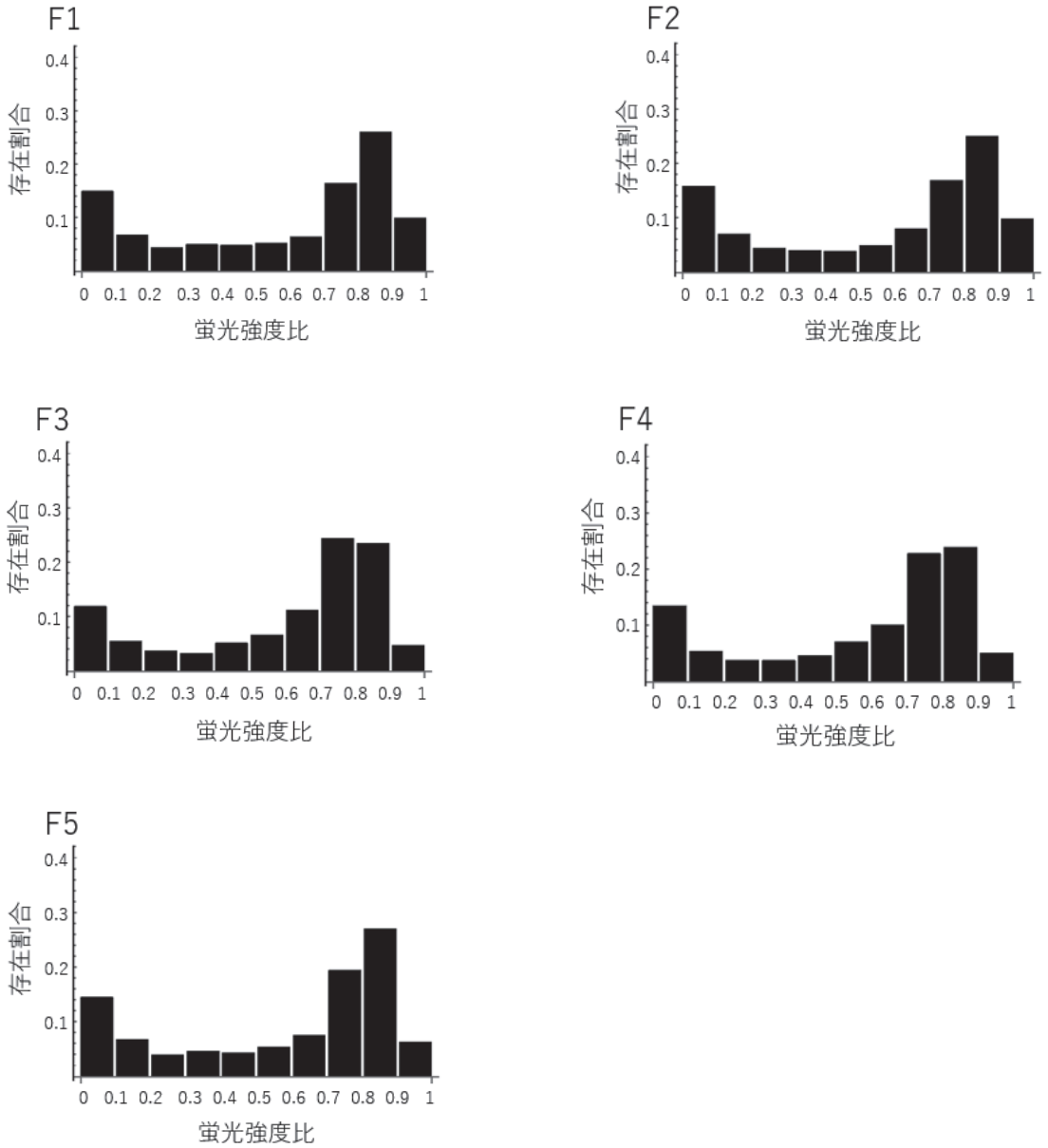

図１　Tween60 を乳化剤として調製したナノエマルジョンの室温下混合処理後の２次元蛍光画像における全蛍光強度比のヒストグラム。
F1：microfluidizer 10,000psi 1 回混合、F2：microfluidizer 10,000psi 2 回混合、F3：microfluidizer 10,000psi 3 回混合、F4：microfluidizer 10,000psi 4 回混合、F5：microfluidizer 10,000psi 5 回混合。

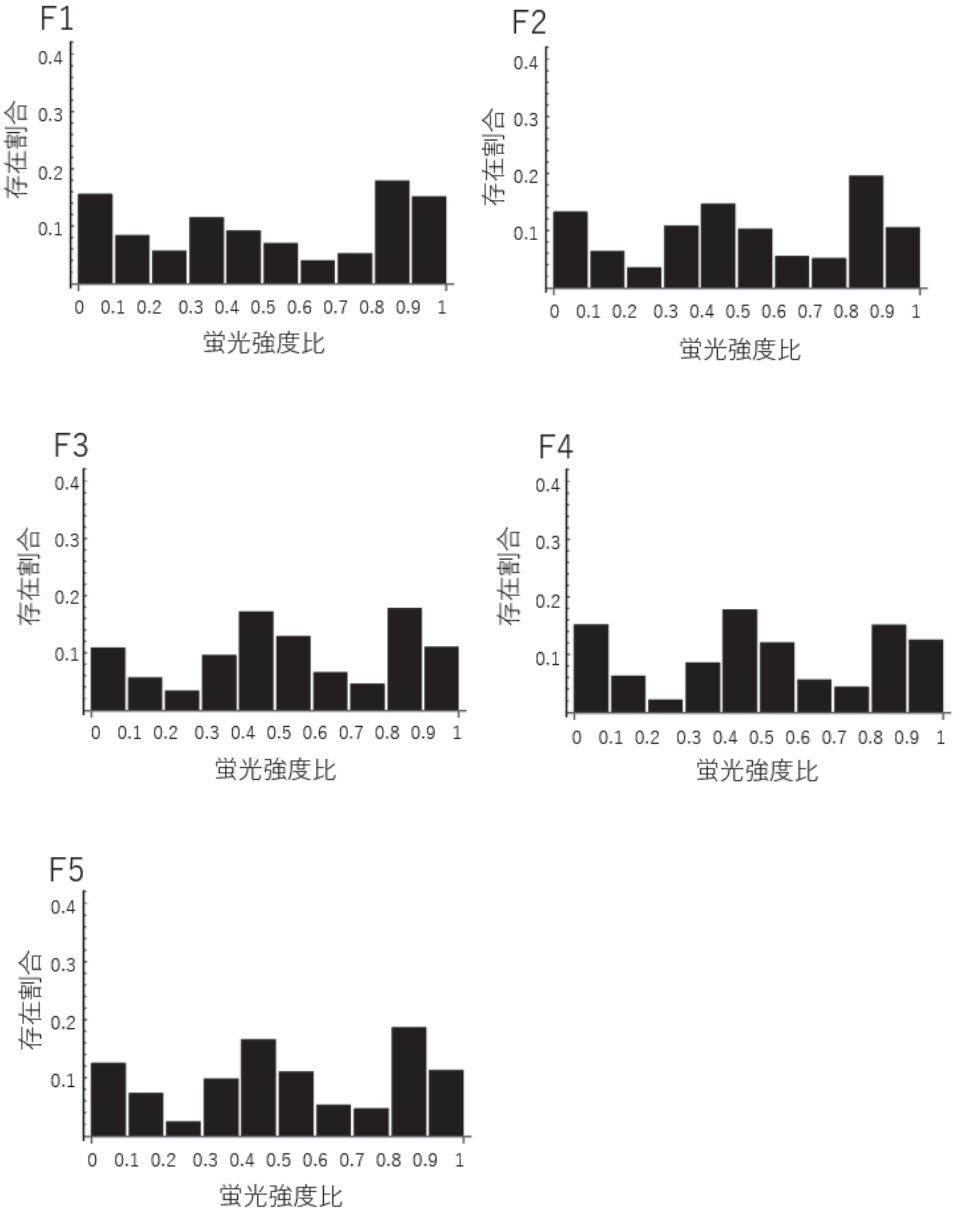

図 2　Tween60 を乳化剤として調製したナノエマルジョンの 60℃加熱下混合処理後の 2 次元蛍光画像における全蛍光強度比のヒストグラム。
F1：microfluidizer 10,000psi 1 回混合、F2：microfluidizer 10,000psi 2 回混合、F3：microfluidizer 10,000psi 3 回混合、F4：microfluidizer 10,000psi 4 回混合、F5：microfluidizer 10,000psi 5 回混合。

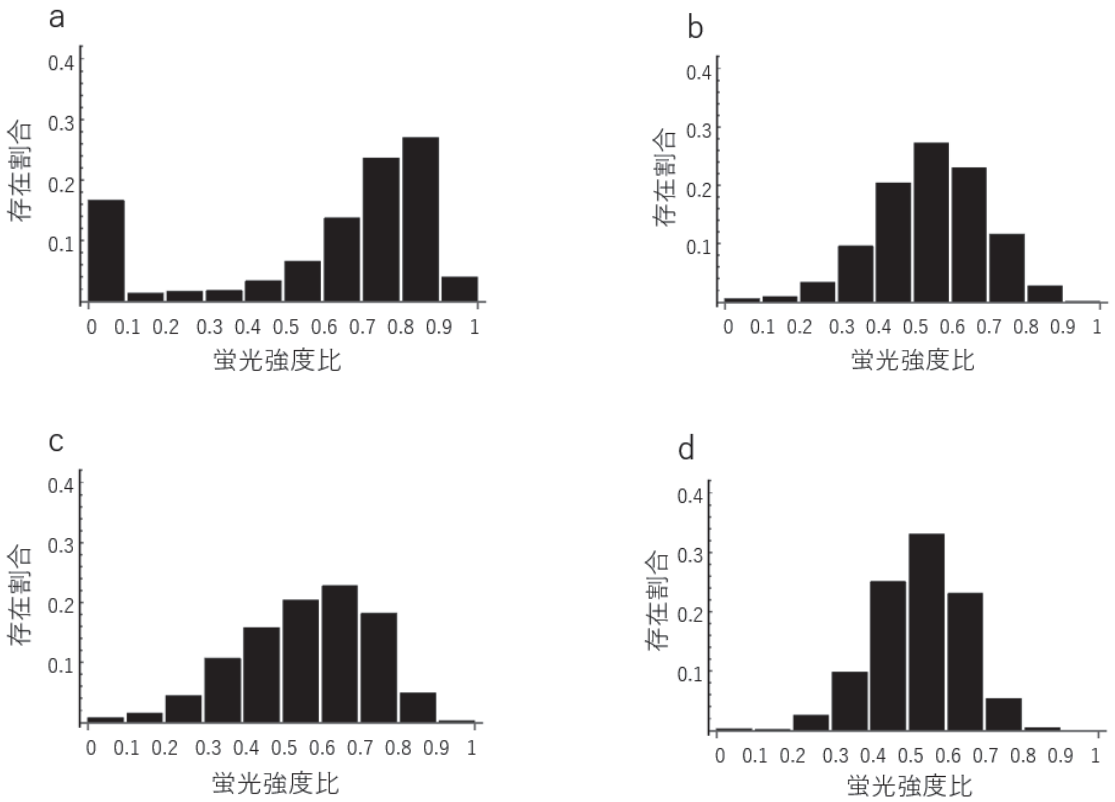

図３　PC を乳化剤として調製したナノエマルジョンの室温下混合処理後の２次元蛍光画像における全蛍光強度比のヒストグラム。
a：PEG でサンプルを希釈後混合、b：PEG 溶液内でサンプルを混合、c：ボルテックスミキサーで１分間混合、d：高速分散ハイシアーミキサーで 10,000rpm ２分間混合。

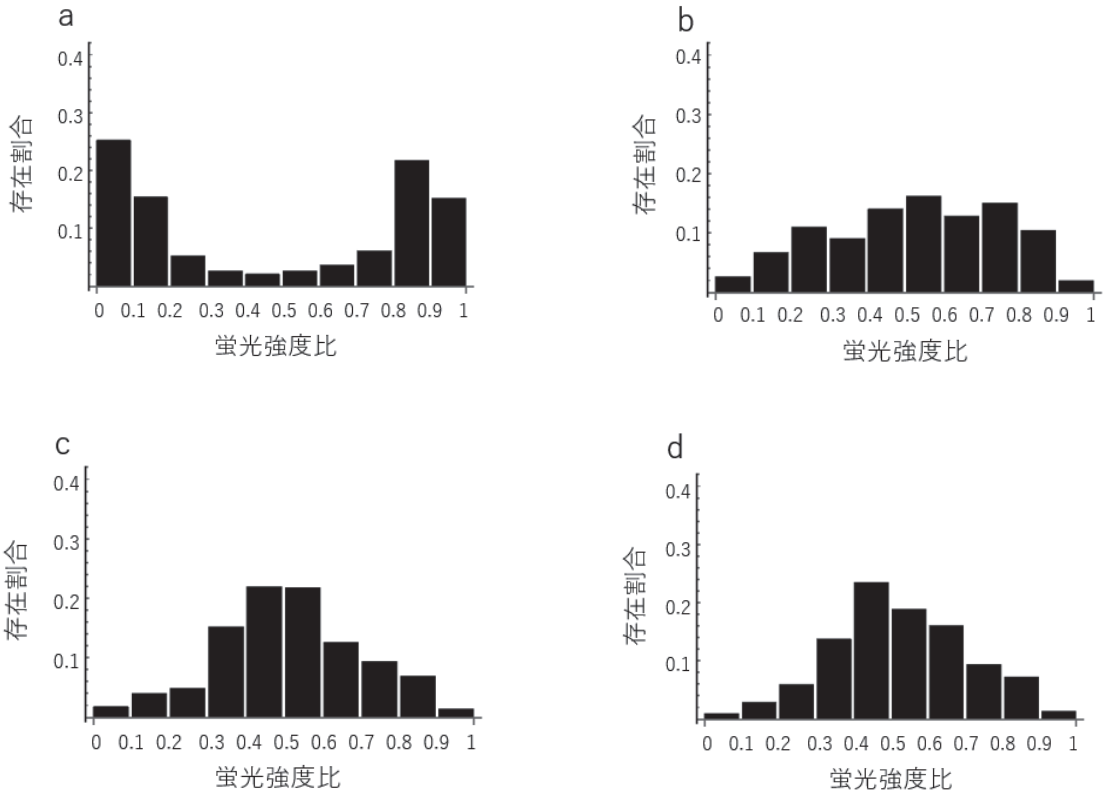

図 4　LPC を乳化剤として調製したナノエマルジョンの室温下混合処理後の 2 次元蛍光画像における全蛍光強度比のヒストグラム。
a：PEG でサンプルを希釈後混合、b：PEG 溶液内でサンプルを混合、c：ボルテックスミキサーで 1 分間混合、d：高速分散ハイシアーミキサーで 10,000rpm 2 分間混合。

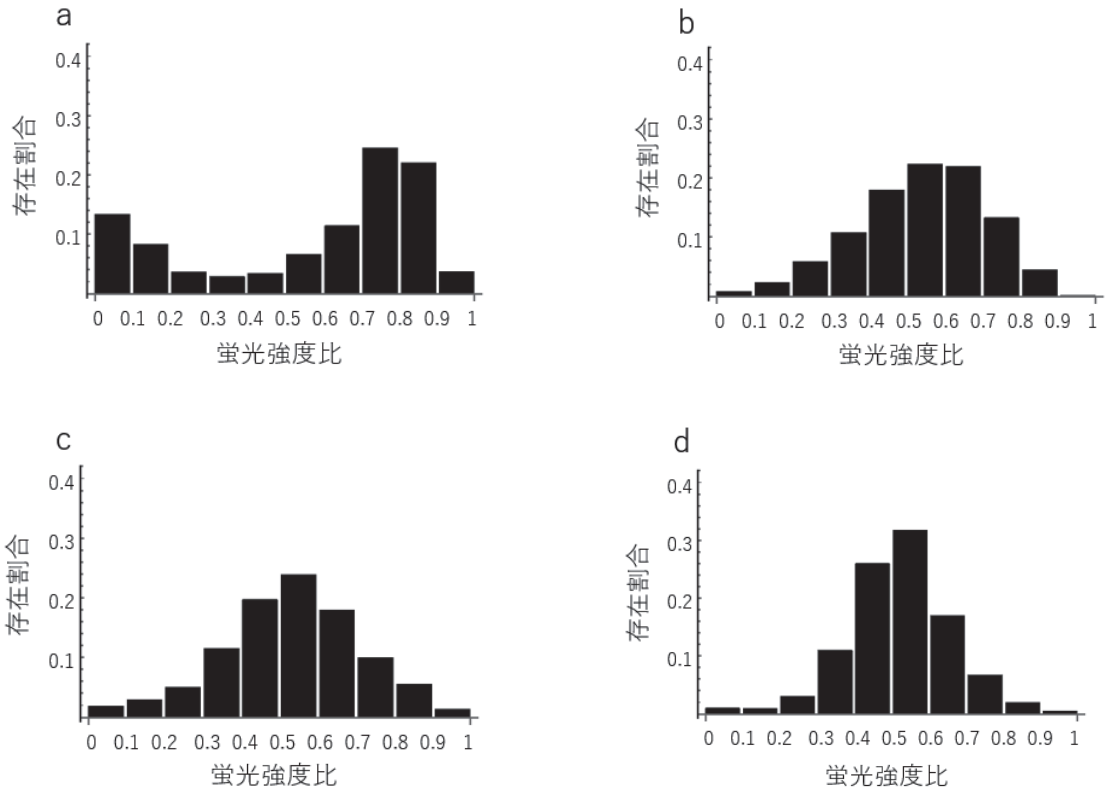

図 5　混合 PC/LPC を乳化剤として調製したナノエマルジョンの室温下混合処理後の 2 次元蛍光画像における全蛍光強度比のヒストグラム。
a：PEG でサンプルを希釈後混合、b：PEG 溶液内でサンプルを混合、c：ボルテックスミキサーで 1 分間混合、d：高速分散ハイシアーミキサーで 10,000rpm 2 分間混合。

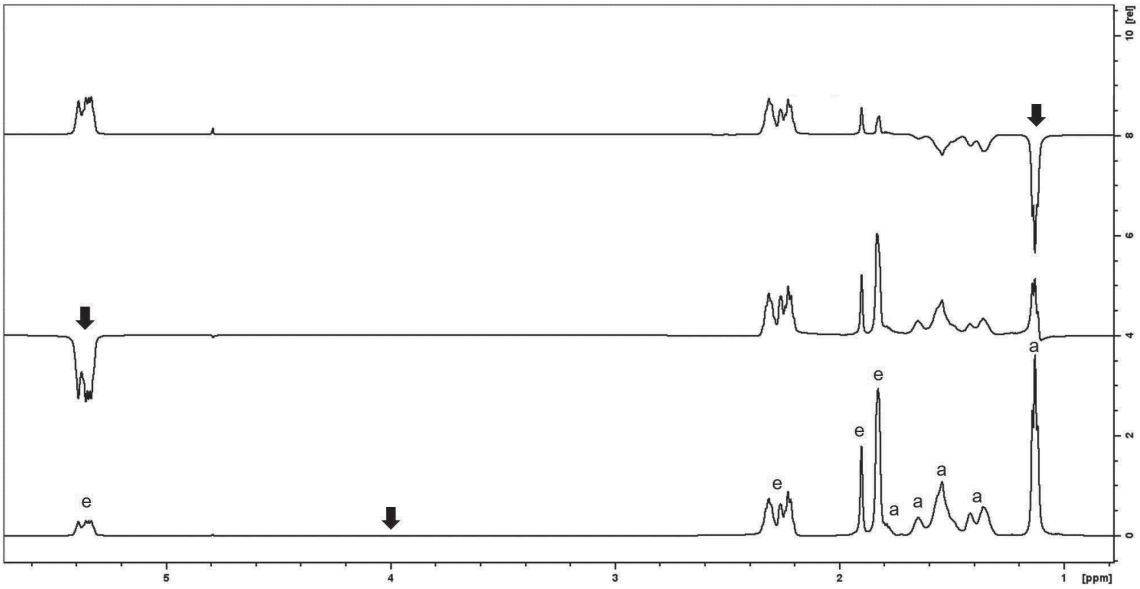

図６　スクアランとスクアレンの混合試料の事前飽和スペクトル。