

原著論文

グリチルリチン酸モノアンモニウム (MG) の 結晶化温度と結晶形状の関係

Relationship between Crystallization Temperature and Crystal Shape of Monoammonium Glycyrrhizinate (MG)

兼永洋希, 小川 薫*, 李 利新, 水戸部裕子,
鈴木映一, Luis A. Guzman, 清水健司
岩手大学工学部応用化学科, *財いわて産業振興センター

Hiroki Kanenaga, Kaoru Ogawa*, Lixin Li, Yuko Mitobe,
Eiichi Suzuki, Luis A. Guzman, and Kenji Shimizu
Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Iwate University
*Advanced Science and Technology Institute, Iwate Industrial Promotion Center

(received January 21, 2003; accepted for publication July 25, 2003)

Studies of the deposit concentration and crystal shape of Monoammonium Glycyrrhizinate (MG) were made. For the purpose of observation of basic data for batch crystallization experiment, the deposit concentration was measured at different mixtures (75-25, 80-20 and 85-15) vol % of ethanol-water. To obtain the relation between MG purity, ΔT (difference of the temperature of a fixed deposit concentration solution and crystallization temperature) and crystal shape, the shape of produced crystals was observed at different MG purity and different ΔT ($\Delta T = 1, 5, 10, 20, 30$ and 40°C) by a controlled batch crystallization. In the case of MG purity 68.8 wt %, rectangle crystal shape was observed. In the case of MG purity 50 wt %, the crystal shape changed from rectangle to octagon and hexagon-like. In the case of MG purity 35.2 wt %, lozenge crystal shape was observed. It was found that the degree of purity and ΔT influenced markedly the shape of produced crystals.

E-mail : kshimizu@iwate-u.ac.jp

岩手大学工学部応用化学科

〒020-8551 岩手県盛岡市上田 4-3-5

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering,
Iwate University

4-3-5 Morioka 020-8551, Japan

財いわて産業振興センター

〒020-0852 岩手県盛岡市飯岡新田 3-35-2

岩手県先端科学技術研究センター内

Advanced Science and Technology Institute,
Iwate Industrial Promotion Center

Morioka 020-0852, Japan

§1 緒言

医薬品, 化粧品, および食品など, 人体へ投与されるものに配合される機能性物質として, 安全性の高い天然由来の素材を採用することが多くなってきている。その際, 天然物をそのまま製品へ使用されることはあまり無く, なんらかの処理を加えたものを製品へ配合することが多い。効率的に有効成分のみを摂取するためには, 有効成分の精製は必要不可欠である。そのような精製方法の1つに晶析があり, 工場現場では大量生産の必要性から回分晶析が多く用いられている¹⁾。回分晶析において得られる製品結晶の品質を決定する大きな因子として, 純度, 粒径, および形状があげられ, その制御方法の確立のために古くから研究がなされているが, いまだ成し遂げられていない。特に最近注目されている, 天然物のような多成分系からなる目的成分の結晶化による純度や形状の制御は困難を極めている。しかし, 生産せざるを得ないのが現状である。

本研究で対象とした試薬の主原料である甘草は, ヨーロッパおよびアジア原産のマメ科の植物で, 主にシルクロード沿いに生息する。1~2mになる地下茎, 走出茎をもつ多年草, もしくは準低木

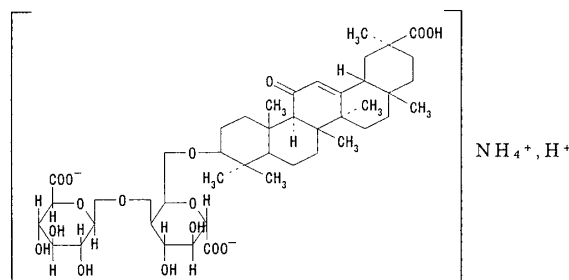


Fig. 1 Structural formula of Monoammonium Glycyrrhizate (MG).

で、採取した根を乾燥させて使用される。世界的に最も広く薬学的研究が進んでいる薬用植物^{2,3)}の一つで、日本へ輸入される生薬の中では最大量である。漢方薬としてだけでなく、医薬品や化粧品、また食品や食品添加物として、すでに国内外に広く流通している。特にその機能性成分であるグリチルリチン酸モノアンモニウム(構造式を Fig. 1⁴⁾に示し、以下、MG と略記する)は、医薬品業界では、抗炎症作用、解毒作用、抗アレルギー作用、抗消化性潰瘍、肝障害改善作用を利用して胃腸薬、塗布薬などに、また、食品業界では、砂糖の 180 倍の甘みを利用して、みそ、醤油、漬物などの含塩食品などに利用されている。

本研究で取り上げた甘草を抽出処理して得られる甘草粗抽出物は、コストや生産性の関係で、工業的には MG 純度 50 wt % 程度にまでしか精製されず、それ以上の純度を求めるためには晶析に頼らざるを得ないのが現状である。しかし、工業的に生産され広く流通しているにもかかわらず、溶解度や結晶形状などの基礎データすら報告はない。それゆえ、高品質の製造レベルを確立するために甘草粗抽出物からの MG の結晶化現象の解明が要求されているのが現状である。そこで、その結晶化現象を解明する第 1 段階として、回分晶析を行うために必要な基礎データである結晶析出濃度を測定した。さらに析出する結晶形状に着目し、結晶形状制御を目的に、甘草抽出物の MG 純度と結晶形状の関係、また、所定の結晶析出濃度溶液の温度と結晶化温度の差(ΔT)と結晶形状の関係を調べた。

§2 実験

2.1 試料

本研究にて使用した試料を以下に示す。

- ・甘草粗抽出物粉末(MG 純度 50 wt %, 丸善製薬(株)製)
- ・溶媒は、エタノール(特定エタノール 99 vol % 以上, 日本アルコール販売(株)製), および自動純粋装置を用いてイオン交換後蒸留した水を使用して作成した。

2.2 結晶析出濃度

回分晶析を行うための必要な基礎データである甘草粗抽出物粉末の結晶析出濃度を測定した。なお測定は、甘草粗抽出物粉末(MG 純度 50 wt %)の中には主成分以外に単離分析できない有用成分も多数混在しているので、以下の方法により行った。50 ml 封入できる密閉容器に、溶媒 30 ml と所定量の甘草粗抽出物粉末(MG 純度 50 wt %)を加え、75°C で完全に溶解し、溶解度測定用サンプルを作成した。甘草粗抽出物粉末は 60°C 以上の温水には溶解するが、それを下回るとゲル状になり、またエタノールに対しては極めて溶解性が悪いが、含水エタノールには溶解するので、溶媒は 20°C における volume 比で 85, 80 および 75 vol % であるエタノール水溶液を用いた。以後、エタノール水溶液の濃度は 20°C における volume 比で示す。測定温度は 20, 30, 40, 50 および 60°C について行った。1 例として、溶媒 85 vol % エタノール水溶液、測定温度 20°C の場合、甘草粗抽出物粉末(MG 純度 50 wt %)は、予めだまかに決定された結晶析出/未析出境界濃度付近の濃度数種類である 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 および 1.1 wt % の量を用いた。その数種類のサンプルを 20°C に保持された恒温槽に 2 日間静置させ、結晶が析出しない最も高い濃度を結晶析出濃度とした。たとえば、0.8 wt % のサンプルは結晶が析出せず 0.9 wt % のサンプルは結晶が析出した場合、結晶析出濃度を 0.8 wt % と決定した。

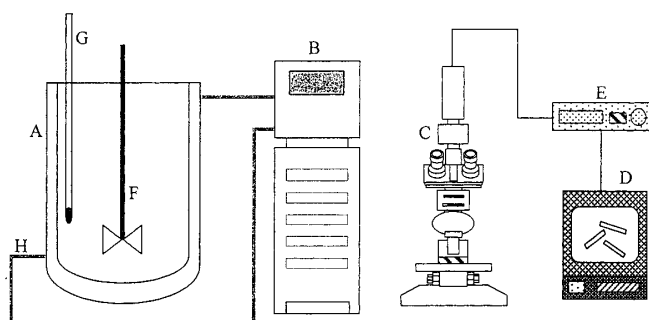


Fig. 2 Experimental apparatus.

- A : Batch crystallizer
 B : Programmable temperature bath
 C : Optical Microscope
 D : Monitor
 E : Video recorder
 F : Impeller
 G : Thermometer
 H : Motor.

2.3 MG 純度および ΔT と結晶形状の測定

2-3-1 実験装置

実験装置を Fig. 2 に示す。晶析槽 A は容量 500 ml のガラス製ジャケット付き攪拌槽を用い、温度制御装置 ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) にて温度を制御した。実験に使用する溶液を晶析層に投入した。攪拌羽根は、ステンレス製傾斜型 6 枚羽根で、層底より 25 mm の高さの所に取り付けた。

2-3-2 純度分析

実験に使用する試薬や、結晶化により得られる結晶および母液の品質を評価する 1 つの手段として MG 純度の分析を行った。分析は、和光純薬(株)製グリチルリチン酸モノアンモニウム純品 (99 wt % 以上) を基準に、高速液体クロマトグラフィーを用いて行った。分析条件を Table 1 に示す。なお、分析法は、日本薬局方⁵⁾ に準じた。さらに、純度分析それぞれは 3 回ずつ分析し、平均値を純度分析結果とした。その際の誤差は ± 0.05 wt % であった。

2-3-3 試料作成

MG 純度と結晶形状の関係を調べるために、3 種類の純度の試料を作成した。試料作成のために、まず 59°C の飽和溶液にあたる甘草粗抽出物粉末 (MG 純度 50 wt %) 24.5 g および 85 vol % エタノール水溶液 425 g を晶析層に投入し、 70°C まで加温して完全に溶解した。150 rpm で攪拌しながら 20°C まで $2^\circ\text{C}/\text{h}$ の速度で冷却し、さらにその温度で 3 時間保持し、結晶の析出した懸濁溶液を固液分離して (孔径 $1.0 \mu\text{m}$, アドバンテック東洋(株)製)、結晶と母液を得た。さらに母液の溶

Table 1 MG purity analysis condition using HPLC.

Column	ODS (Diameter of inner=4.6 mm, length=25 mm, "Wakosil-II U5C18" produced by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)
Eluent	2 % Acetic acid : 98 % Acetonitrile 55 % Acetic acid : 45 % Acetonitrile
Flow rate	1.0 ml/min
Detection	UV at 254 nm
Temperature	40°C

媒は減圧下で留去して、母液乾燥物を得た。ここで得た結晶 (MG 純度 68.8 wt %) および母液乾燥物 (MG 純度 35.2 wt %), さらに既存の甘草粗抽出物粉末 (MG 純度 50 wt %) を 3 種類の MG 純度の試料とした。

2-3-4 MG 純度および ΔT と結晶形状の関係

MG 純度と結晶形状の関係、および ΔT と結晶形状の関係を調べるために、Case 1-3 の実験を行った。まず Case 1 として § 2-3-3 にて得られた結晶の 50°C での結晶析出濃度である溶液を作成するために、結晶 (MG 純度 68.8 wt %) 10.9 g と 85 vol % エタノール水溶液 425 g を晶析槽に投入し、 70°C まで加温して完全に溶解した。次に Case 2 として同じく § 2-3-3 にて得られた母液乾燥物の 50°C 結晶析出濃度溶液を作成するために、母液乾燥物 (MG 純度 35.2 wt %) 87.0 g と 85 vol % エタノール水溶液 425 g を晶析槽に投入し、Case 1 と同様に完全に溶解した。なお、この結晶 10.9 g と母液乾燥物 87.0 g という仕込み量は、あらかじめ別実験で測定したそれぞれの試料の 50°C における結晶析出濃度をもとに決定した。次に Case 3 として甘草粗抽出物粉末の 50°C 結晶析出濃度溶

液を作成するために、前述の結晶析出濃度測定結果に基づいて甘草粗抽出物粉末(MG 純度 50 wt %) 15.4 g と 85 vol % エタノール水溶液 425 g を晶析槽に投入し、Case 1 と同様に完全に溶解した。Case 1-3 について、それぞれ 150 rpm で攪拌しながら 55°C まで急冷し、55°C から冷却速度 10°C/h で Case 1, 2 の場合、所定結晶化温度 49, 45, 40, および 30°C ($\Delta T=1, 5, 10, \text{および } 20^\circ\text{C}$) まで、Case 3 の場合、所定結晶化温度 49, 45, 40, 30, 20, および 10°C ($\Delta T=1, 5, 10, 20, 30 \text{ および } 40^\circ\text{C}$) まで冷却して、冷却開始から 19 時間後まで温度を保持した。実験の温度変化および操作を Fig. 3 に示す。結晶形状は、晶析槽内にすばやく 20 ml メスピペットを差し込み、懸濁液約 1 ml を採取し、シャーレに入れて顕微鏡で観察録画した。Case 1, 2 についてはその後、残りすべての懸濁液を固液分離して、X 線粉末回折(XRD)測定にて得られた結晶の構造解析を行った。

§3 結果および考察

3.1 結晶析出濃度

結晶析出濃度測定結果を Fig. 4 に示す。縦軸に結晶析出濃度 C (溶質/溶液の重量百分率[wt %])、横軸には温度 t [°C] をとった。

測定値より次の実験式を得た。

i) 75 vol % エタノール水溶液

$$C = 0.7992 e^{0.0518t}, R = 0.998 \quad (1)$$

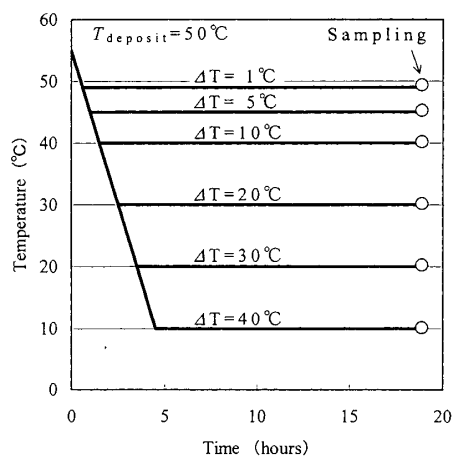


Fig. 3 Cooling profile of solution temperature with time at $\Delta T=1, 5, 10, 20, 30$ and 40°C .

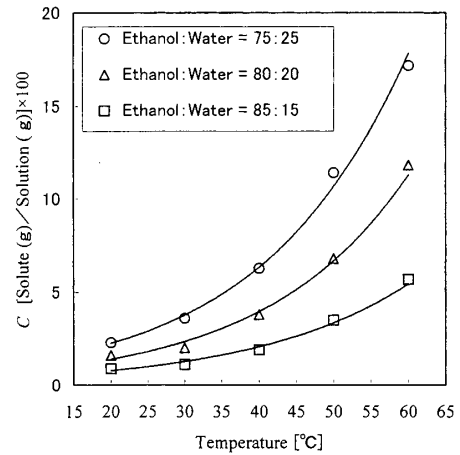


Fig. 4 Temperature dependence of deposit concentration of the rough Licorice extract (MG purity = 50 wt %) in ethanol-water mixtures.

ii) 80 vol % エタノール水溶液

$$C = 0.4190 e^{0.0522t}, R = 0.991 \quad (2)$$

iii) 85 vol % エタノール水溶液

$$C = 0.2968 e^{0.0485t}, R = 0.989 \quad (3)$$

R は相関係数である。本式の適用範囲は、 $20^\circ\text{C} \leq t \leq 60^\circ\text{C}$ である。なお、Fig. 4 中の実線は本実験式による計算曲線である。

溶媒の含水率が 15-25 vol % の間では、甘草粗抽出物の結晶析出濃度は、溶媒の含水率が高くなるにつれて増加した。

3.2 MG 純度および ΔT と結晶形状の関係

Case 1 および 2 の結晶形状の写真および XRD 測定結果を Fig. 5 および Fig. 6 に、Case 3 の結晶形状写真を Fig. 7 に示す。Fig. 5 および Fig. 6 より、いずれの結晶化温度においても、使用した試料の MG 純度が 68.8 wt % と高い場合は柱状の形状、MG 純度が 35.2 wt % と低い場合は菱形の形状が観察された。ここで、Fig. 8 にすべての実験系で初期に発生する結晶形状写真を示す。写真から、初期に発生する結晶は葉状の形状であるが、Figs. 5-7 のいずれの写真においても葉状の形状は確認できないことから、Figs. 5-7 の成長した結晶は、初期に発生した葉状の結晶から成長したことが推察された。ただし、葉状結晶からの成長過程を実際に観察できていないので、本推察はあくまでも可能性の 1 つである。またそれぞれの

XRD 結果を比較すると、若干の差異が確認できる。これは、本実験にて得られる結晶の構造性が乾燥度によって変化し、さらに、XRD の測定を行うそれぞれの結晶の乾燥状態を測定ごとに全く同一にすることが困難であるためと予想している。しかし主要なピーク位置についてはいずれの結晶においてもほぼ同等の結果であり、結晶形状は異なっている、結晶多形のような結晶構造性

の大きな違いはないことがわかった。

次に Fig.7 より、 ΔT が高くなるにつれて、得られる結晶形状が柱状から、次第にその柱状の角が小さく取れた八角形へ、さらに取れた角が大きくなり六角形に近い形へと変化することがわかった。これは、 ΔT が高いほど結晶成長速度が増加し、不純物をより多く取り込んでしまうということも可能性の一つとして挙げられる。このことは

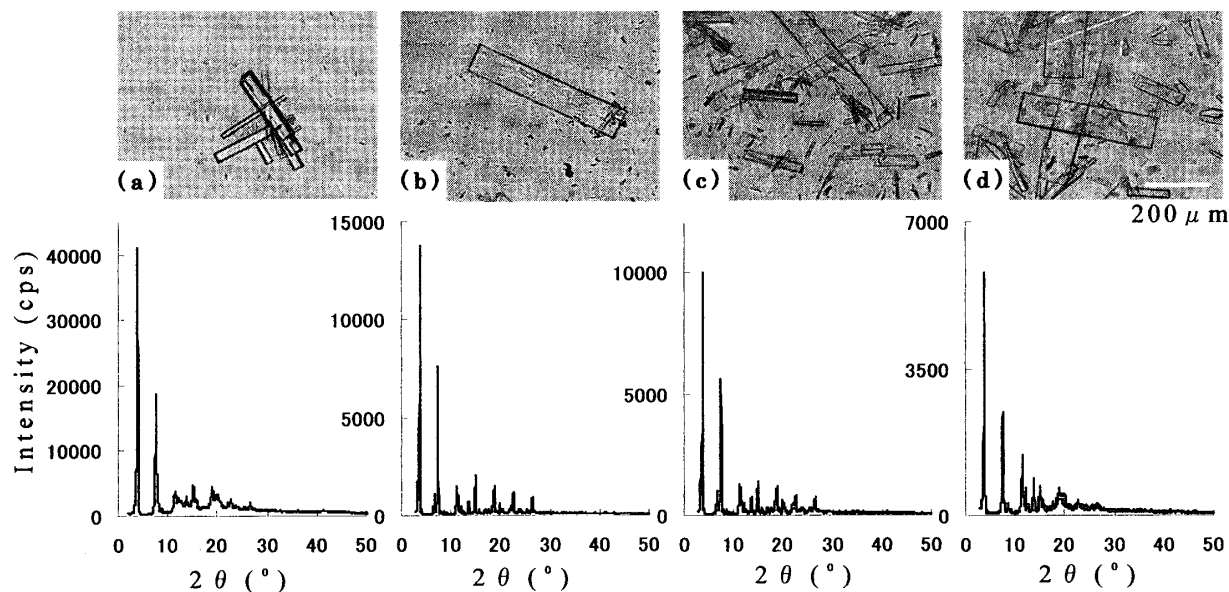


Fig. 5 Photographs and XRD analysis of MG crystals (purity = 68.8 wt %) at (a) $\Delta T = 1^\circ\text{C}$, (b) $\Delta T = 5^\circ\text{C}$, (c) $\Delta T = 10^\circ\text{C}$, and (d) $\Delta T = 20^\circ\text{C}$.

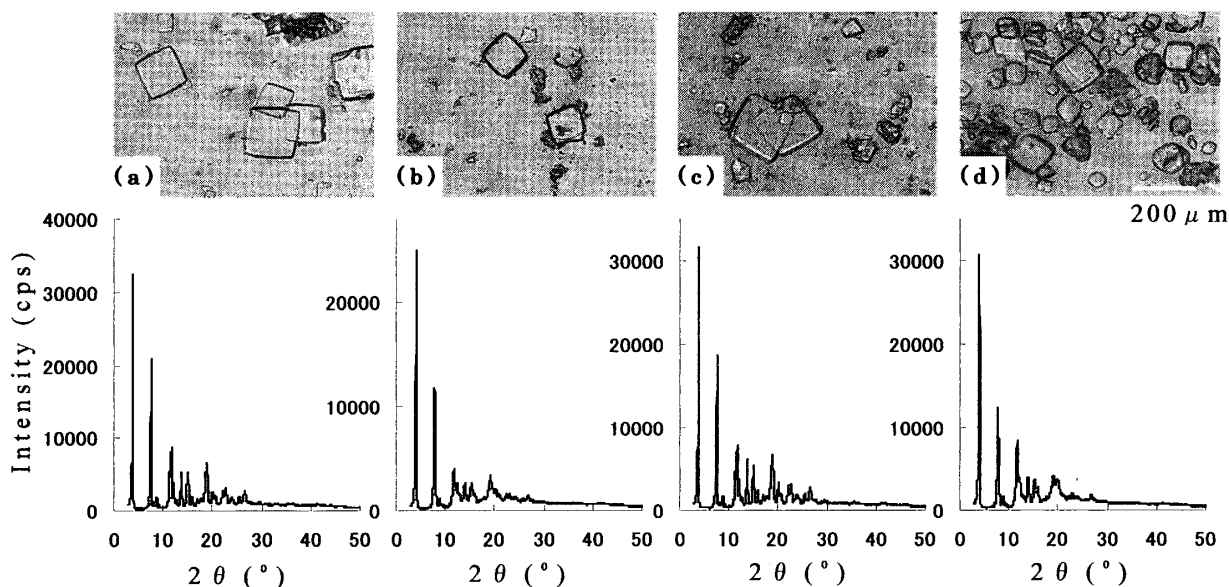


Fig. 6 Photographs and XRD analysis of MG crystals (purity = 35.2 wt %) at (a) $\Delta T = 1^\circ\text{C}$, (b) $\Delta T = 5^\circ\text{C}$, (c) $\Delta T = 10^\circ\text{C}$, and (d) $\Delta T = 20^\circ\text{C}$.

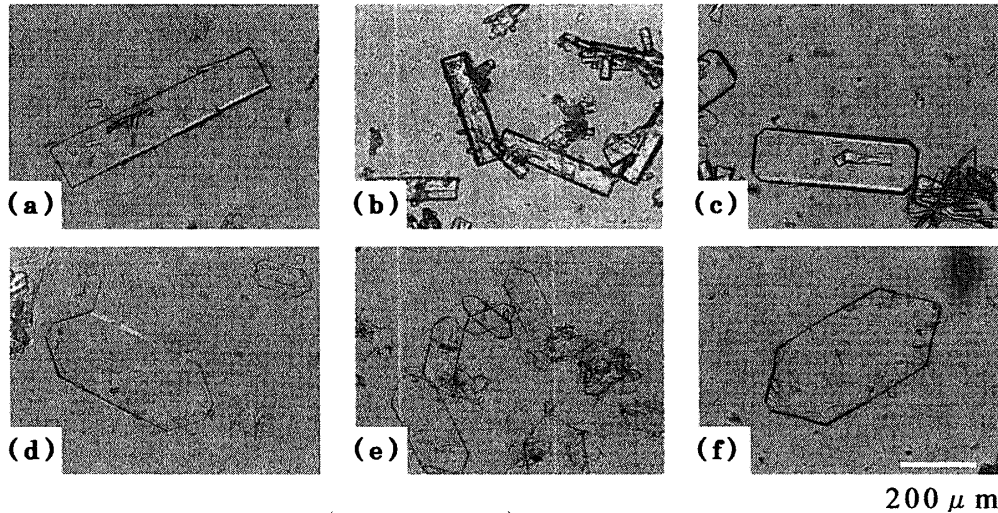


Fig. 7 Photographs of MG crystals (purity = 50 wt %) grown at (a) $\Delta T = 1^\circ\text{C}$, (b) $\Delta T = 5^\circ\text{C}$, (c) $\Delta T = 10^\circ\text{C}$, (d) $\Delta T = 20^\circ\text{C}$, (e) $\Delta T = 30^\circ\text{C}$, and (f) $\Delta T = 40^\circ\text{C}$.

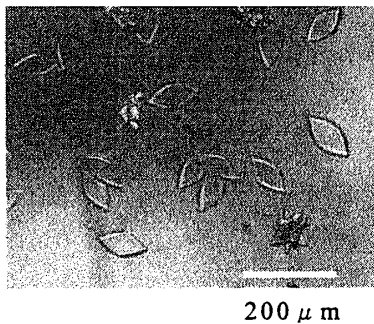


Fig. 8 Photographs of leaf-like crystals in the initial stage of crystallization.

実験で得られた結晶の MG 純度が $\Delta T = 1^\circ\text{C}$ の場合 78.2 wt %, $\Delta T = 40^\circ\text{C}$ の場合 67.3 wt % であったことから推察できる。また, Fig. 6 にて観察された菱形の形状, および Fig. 7 の六角形に近い形からさらに角が取れた形状について, それぞれ破損していないもの 10 個ずつをランダムに選択し, 菱形の面間の角度と六角形から角を取る面間の角度を測定した結果, いずれも $85^\circ - 90^\circ$ であることから, Fig. 6 の菱形は, Fig. 7 の六角形に近い形からさらに角が取れた形状であることが推測された。

以上の結果を総括して, Fig. 9 に結晶成長のモデルを示す。溶液中の MG 純度によって, 各成長面の相対的な成長速度が変化し, 結果的にそれぞれの結晶形状になることを推察した。今後, 発生初期からの途中段階での結晶形状の観察を詳

細に行い, 結晶成長の様子を明らかにする予定である。

ここで, 不純物の取り込みモデルについて考察すると, 一般的に不純物効果は, 溶液中の不純物濃度(溶液単位体積当たりの不純物重量, w/v %)に依存し, その濃度をパラメータとして, KDP 単結晶や Si 単結晶の不純物元素効果の報告においても議論されている⁶⁾。しかし, それらの多くは結晶化物質と不純物が全く異質の物質であり, 不純物の濃度も ppm オーダー程度の極微量であることが多いが, 本論文で扱っているのは, 天然由来の分子構造が類似した成分も含む多量多成分の不純物存在下(総不純物濃度 0.68-11.3 w/v %)

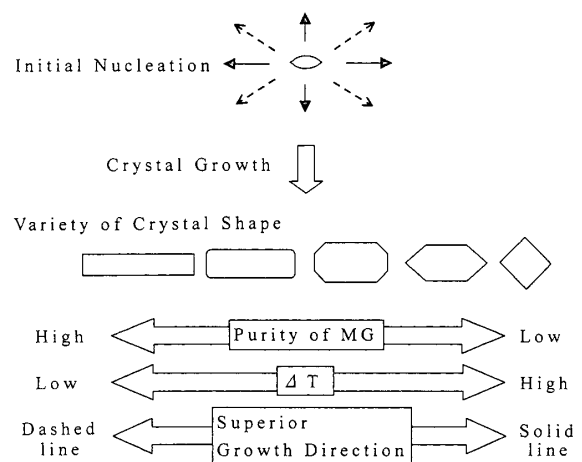


Fig. 9 Model of relationship between the MG purity, ΔT and crystal shape.

での、MGの精製過程における結晶化であるので、本論文における不純物効果と、一般的に解説されている不純物効果とを、一概に同等に考えにくいところがある。本論文で扱うような結晶は、非常に多くの類似の構造の不純物を含むことから、MG分子が結晶化する過程において、不純物との相互作用が大きな効果を持ち、結果としてその相対比(溶質中のMGと総不純物の比)が不純物取り込みを左右しているのではないかと予想している。しかし前述したように、使用した試料は天然物であることから、たくさんの微量成分からなり、単離も困難で、現段階では、どの不純物が結晶形状に影響を及ぼしているのかは不明であり、MG分子と不純物の相互作用が結晶形状に直接的に影響を及ぼしているのかも含め、今後、明らかにする予定である。しかし、結晶形状は最終製品の品質に極めて大きく影響し、工業的に回分晶析における結晶形状制御法の確立が急務であり、この結果が充分役立つものと考えられる。

§4 結言

- ・甘草粗抽出物からMG結晶を晶析する工業的

基礎データとして、結晶析出濃度および結晶形状の測定を行った。

- ・溶媒として選択したエタノール水溶液の含水率が高くなるほど、甘草粗抽出物の結晶析出濃度は高くなった。
- ・甘草粗抽出物のMG純度、および ΔT を変えて回分晶析にてMG結晶を析出させたところ、結晶形状は純度が高いと長方形、低いと菱形になった。また、 ΔT を高くするにつれて、結晶形状は柱状から、次第にその柱状の角が小さく取れた八角形へ、さらに取れた角が大きくなり六角形に近い形へと変化した。

以上のようにMG結晶の形状とMG純度、および ΔT の関係を明らかにした。

[参考文献]

- 1) R. Kokubo, K. Ichikawa, *et al.*: 増補 晶析(化学工業社, 1983).
- 2) C. Capra: *Fitoterapia*, **38** (1967) 48.
- 3) F.D. Herman: *Gut.*, **11** (1070) 334.
- 4) 日本工程書協会: 化粧品原料基準(薬事日本社, 2001).
- 5) 日本薬局方解説書編集委員会 編: 第14改訂 日本薬局方解説書(廣川書店, 2001).
- 6) 日本結晶成長学会“結晶成長ハンドブック”編集委員会 編: 結晶成長ハンドブック(共立出版, 1995).