



フェデリコ II 世ナポリ大学

薬学部

AnnurtriComplex® Plus からのプロアントシアニジン B2 の生体到達度の評価

プロアントシアニジン B2 (PB2) の生体到達度が、AnnurtriComplex® Plusを参照化合物として、次に述べる *in vitro* 消化シミュレーションにおいて評価されました。特に、胃耐性カプセルと非胃耐性カプセルにカプセル化された抽出物からの、PB2の生体到達度を比較することに重点が置かれました。

さらに、この研究の第二の目的は、Folin-Ciocalteu 法を使用して2つのサンプルの総ポリフェノール含有量を評価することでした。この二重のアプローチにより、抽出物の生物活性化合物送達効率とそのポリフェノールプロファイルを包括的に理解することができます。これは、AnnurtriComplex® Plus の潜在的な健康上の利点を判断するために重要です。

実験方法

1. *In Vitro* での消化管消化のシミュレーション

実験手法は、ヒトの消化状態をシミュレーションするために広く認識されている INFOGEST標準プロトコルに準拠した、模擬 *in vitro* 消化プロセスに基づいています。AnnurtriComplex® Plus は、胃耐性と非胃耐性の2つの異なるカプセルタイプにカプセル化されました。胃腸消化のために、カプセルを KCl (37.3 g/L)、KH₂PO₄ (34 g/L)、NaHCO₃ (84 g/L)、MgCl₂(H₂O)₆ (30.5 g/L)、(NH₄)₂CO₃、および 50 mg の α -アミラーゼで構成される模擬唾液 (SSF) 3.5 mL と混合しました。溶液のpHをHCl 0.1Nで6.8に調整し、Polymax 1040オービタルシェーカー (250 rpm) (Heidolph、シュヴァーバツハ、ドイツ) で37°Cで3分間培養しました。その後、7.5 mLの人工胃液 (SGF) と59.2 mgのペプシンを加え、HCl 6NでpHを3.0に調整し、溶液を2時間培養しました。次に、11 mLの人工腸液 (SIF) を加え、NaOH 1MでpHを7に上げました。最後に、パンクレアチン (2.7 mg/mL) と胆汁酸塩 (20.0 mg/mL) の混合物7.5 mLを加え、オービタルシェーカー (250 rpm) で37°Cで2時間培養しました。混合物を 6000 rpm で遠心分離し、上澄み液を HPLC-DAD 分析に使用しました。生体到達度のパーセンテージは、消化サンプル中の PB2 のマイクログラム数と未消化のコントロールサンプルの相対値に基づいて計算されました。このアプローチにより、消化後に抽出物の PB2 が体内に吸収されやすくなる程度を定量的に測定できました。

2. PB2 の LC-DAD分析

HPLC Jasco Extrema LC-4000 システムに、オートサンプラー、バイナリ溶媒ポンプ、ダイオードアレイ検出器 (DAD)、蛍光検出器 (FLD) を組み合わせました。プロシアニジンは 280 nm でモニターされ、Kinetex® C18 カラム (250 mm × 4.6 mm、5 μ m) で溶出されました。移動相は、2% ギ酸 (A) を含む水と、アセトニトリルと水 50:50 (v/v) 中の 0.5% ギ酸でした。10% 溶媒B で 2 分間保持した後、次の条件に従って溶出を行いました。50 分で 10% (B) から 5% (B) まで、17 分で 95% (B) まで、その後 8 分間維持し、その後、残りの 10 分間でカラムを初期条件に平衡化してカラムを再調整しました。分離条件は次の通

りです。カラム温度は 30 °C、注入量は 20 μ L、流量は 1 mL/分に設定しました。ピークの識別は、保持時間とサンプルへの標準添加に基づいて行いました。化合物は、0.0005~0.1 mg/ml の濃度範囲にわたる 6 種類の異なる濃度の標準で作成された検量線と、各レベルで 3 回注入して定量しました。

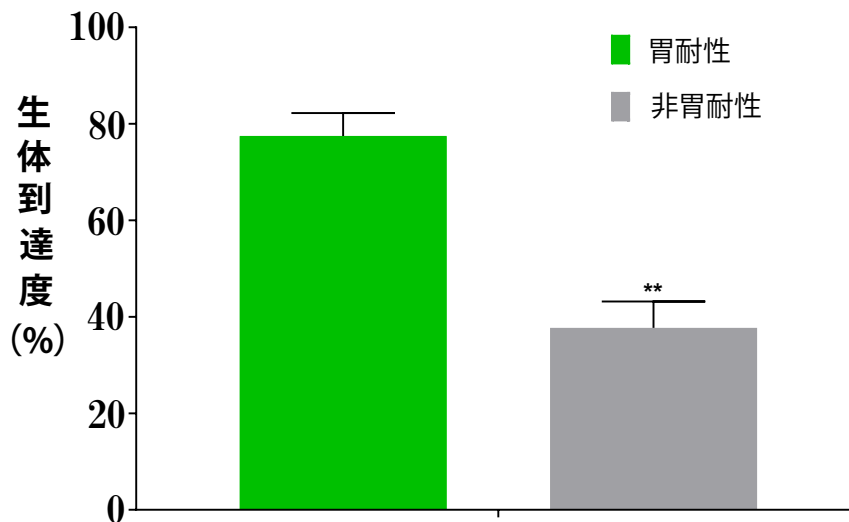
3. 総フェノール含有量 (TPC) の評価

総フェノール含有量 (TPC) は、標準として没食子酸 (Sigma-Aldrich、米国ミズーリ州セントルイス) を使用し、Folin-Ciocalteu 法で測定しました。簡単に説明すると、0.125 mL のサンプル (分光光度計の直線範囲内の吸光度値を得るために水で適切に希釈) に、0.125 mL の Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich、米国ミズーリ州セントルイス) 試薬と 1.25 mL の Na_2CO_3 水溶液 (20%、w/v %) を加え、水で最終容量を 3 mL にします。混合後、サンプルを暗所に 90 分間置きます。反応時間後、760 nm で吸光度を測定します。各サンプルは 3 回分析され、総ポリフェノールの濃度は没食子酸当量 (GAE) で計算されました。

結果

図 1 に示すように、結果は 2 種類の消化方法間において、PB2 の十二指腸の生体到達度に有意な差があることを示しています。胃耐性カプセルは PB2 の放出が遅延を示し、その結果、非胃耐性カプセルと比較して腸管消化段階後の生体到達度が高まりました (それぞれ 77.5% 対 37.7%、 $p < 0.01$)。これは、胃耐性カプセルの保護特性により PB2 がより効果的に送達され、腸管段階での利用可能性が高まることで生物学的効果が高まる可能性があることを示唆しています。

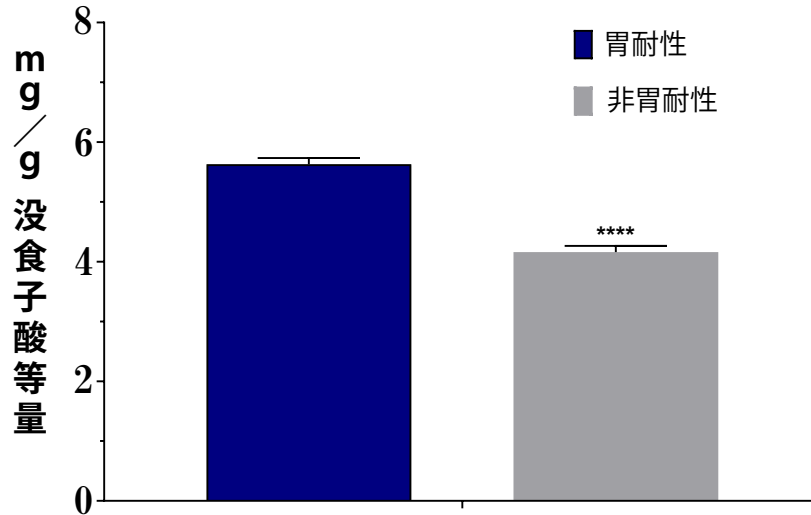
図 1. AnnurtriComplex® Plus 中のプロシアニジン B2 の生体到達度 %



データは、3 回の繰り返しの平均値 \pm 標準偏差として表されます。統計的有意性は、スチューデントの t 検定分析により計算されています; ** $p < 0.01$ vs. 胃耐性型

さらに、図 2 は、Folin-Ciocalteu 法で定量化された両カプセルタイプの総ポリフェノール含有量を示しています。この点で、胃耐性サンプルは非胃耐性の形態と比較して、有意に高い TPC が報告されました (それぞれ 5.63 ± 0.22 vs. 4.16 ± 0.21 , $p < 0.0001$)。

図 2. 消化された AnnurtriComplex® Plus の総フェノール含有量 (TPC)



データは、サンプルの mg 没食子酸当量 (GAE)/g の平均値 \pm 4 回の繰り返しの標準偏差として表されます。統計的有意性は、スチューデントの t 検定分析によって計算されています; **** $p < 0.0001$ vs. 胃耐性型

Prof. Gian Carlo Tenore

2024年8月19日作成

株式会社 光洋商会 www.koyojapan.jp/

〈東京本社〉 〒104-0061 東京都中央区銀座1-19-7 JRE銀座一丁目イーストビル3F Tel:03-3563-7531 Fax:03-3563-7538

〈大阪支店〉 〒530-0002 大阪府大阪市北区曽根崎新地2-6-23 MF桜橋ビル10F Tel:06-6341-3119 Fax:06-6348-1732

