

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 14 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460043

研究課題名(和文) 医薬品の乳化剤とコレステロールの吸収抑制剤としてのグリチルリチン酸の可能性

研究課題名(英文) Possibility of the glycyrrhizic acid as emulsifier for drug and the application to absorption inhibitor of cholesterol

研究代表者

松岡 圭介 (MATSUOKA, Keisuke)

埼玉大学・教育学部・准教授

研究者番号：90384635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：グリチルリチン酸の弱酸基は緩衝水溶液のpHに依存して、表面及び会合体の物性に大きな影響を与えた。水への溶解度は強酸性領域では極めて低いことが分かった(0.15mM)。ミセルを形成できる領域はpH5-6の限られた領域だけであった。その会合体は棒状ミセルと判明した。会合体の形成は乳化剤や可溶化剤として応用できる可能性を示唆した。中性以上ではグリチルリチン酸はモノマー分子としてしか存在できない。故に、グリチルリチン酸を生体界面活性剤として、実在系に適用するには水溶液のpHに注意を払う必要がある。その分子構造と会合構造の関係はグリチルリチン酸の類似化合物の会合体形成を明らかにすることで理解できる。

研究成果の概要(英文)：The glycyrrhizin acid has two carboxylic groups at double glucuronic acids and one carboxylic group on the top of molecule as the hydrophilic part. Therefore, the polyvalent weak acid had a great influence on the surface and aggregate properties depending on the pH of the buffer solutions. The aqueous solubility of glycyrrhizin acid was quite low in the lower pH range. The pH range for micelle formation was quite narrow, from pH 5 to 6. Glycyrrhizic acid forms rod-like micelles. The existence of this aggregate highlights the potential applications of glycyrrhizic acid as an emulsifier and solubilization agent. Glycyrrhizin acid exists as monomer state at pH > 7. Therefore, it is necessary to pay attention to the pH of the solution when this biosurfactant is used as an emulsifier or solubilizer in the practical fields. In future, the aggregation structure based on the specific molecular structure will be examined using similar compounds, glycyrrhetic acid, 3-O-glucuronide.

研究分野：界面化学

キーワード：グリチルリチン酸 ミセル 会合体 臨界ミセル濃度

1. 研究開始当初の背景

グリチルリチン酸は天然由来の化合物としての使用実績から、大量に摂取しない限りは安全性の高い物質として、我々の日常においても有益な物質として知られている。この分子構造は両親媒性構造であるため、界面活性作用をもつことが経験的に知られている。しかしながら、文献調査によると、筆者の知る限りではグリチルリチン酸による会合体形成の代表的な報告は1964年にGilbertによって行われた表面張力測定による臨界ミセル濃度の決定と1976年に報告された砂田らの同様な測定結果しか存在しない。しかし、この両者によって報告されたことはごく一部の現象である。これまでのグリチルリチン酸の使用実績から、安全性が高く、甘味料としても使用されていることから、生体中への適用に関してあらかじめ問題が少ないことが分かっている。そこで、このグリチルリチン酸が会合できる条件や会合体構造の決定を行い、その可溶化能力を定量することができれば、甘味も兼ね備えた医薬品の可溶化剤/乳化剤としての適用範囲も広がる。例えば、子供用の風邪薬のシロップなどは、医薬品の成分が沈殿しており、溶解していないために有効に機能していない問題があげられる。

2. 研究の目的

植物の甘草由来のグリチルリチン酸は甘味料としても知られているが、去痰剤や抗炎症剤として医薬品にも用いられている。その分子構造はトリテルペン系サポニンであり、分子内に親水基と疎水基を所有するため、界面活性作用を持ち合わせている。しかしながら、その水溶液中で会合体形成の特徴だけでなく、可溶化能力は研究されていない。今回、医薬品の可溶化剤としての応用を想定して、グリチルリチン酸の水溶液中の会合挙動を研究する。そこで、甘味も備えたグリチルリチン酸を可溶化剤に用いることができれば、この問題は一挙に解決できる。また、化粧品のクリーム調整剤や乳液の乳化剤としての機能を果たせるだけでなく、分子構造由来の消炎作用をもつため、付加機能をもった乳化剤として機能できる可能性を持っている。この物質の会合体特性を明らかにすることは、医薬品の新しい可溶化剤としての可能性を提示するだけでなく、日常の化粧品やトイレットリー製品の可溶化剤として応用できる可能性を提示する。

3. 研究の方法

(1) 試薬 グリチルリチン酸(98%以上純度)(図1)は栗田工業から購入した。その糖親水基のグルクロン酸が一つ減少したグリチルレチン酸 3-O-グルクロニド(98%以上純度)と二つ減少したグリチルレチン酸(98%以上純度)は長良サイエンス株式会社より購入した。溶液調整は結晶を各緩衝水溶液

(pH5-7)に超音波装置で溶解させた(25)。

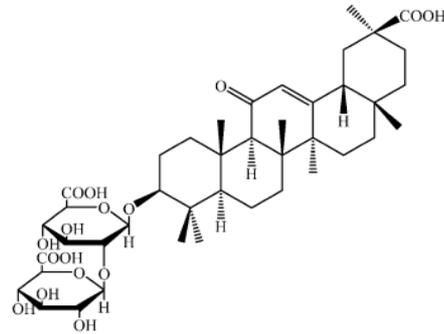


図1. グリチルリチン酸

(2) グリチルリチン酸水溶液の表面張力測定

緩衝水溶液を作成し、表面張力測定機(DyneMaster DY-300YM, KYOWA)を用いて、白金プレートを使用するWilhelmy法から決定した(25)。

(3) グリチルリチン酸類の臨界ミセル濃度の水素イオン濃度依存性

各種緩衝水溶液中で、グリチルリチン酸の濃度を変化させながら、ピレンをプローブとした蛍光プローブ法(装置:FP-8200ST, JASCO, Japan)から決定した。その温度制御はスターラー付恒温セルホルダ(STR-811)を用いた。また、レーザー散乱強度(ALV-5000)を用いて、会合体形成に伴う散乱強度を測定することで臨界ミセル濃度(cmc)の決定をした(25)。

(4) グリチルリチン酸類が形成する会合体のサイズと会合体構造の決定

各種緩衝溶液中におけるグリチルリチン酸類が形成する会合体のサイズと幾何学的形状をSpring-8設置のX線小角散乱測定(BL40B2 beamline)から決定した。

ネガティブ染色法を用いた透過型電子顕微鏡(JEOL JEM-2000FX)とCryo-走査型電子顕微鏡(S-4800)を用いて、その会合体の構造を撮影した。

4. 研究成果

(1) グリチルリチン酸の会合体形成

グリチルリチン酸の水への溶解度

図1に示すように、グリチルリチン酸は糖親水基に2つのカルボン酸とその分子の頭部に1つのカルボン酸をもつ。故に、計3個の弱酸基が水溶液物性を支配していることが分かる。研究の初期段階で、通常の方法で結晶をイオン交換水に溶解しても、0.15mMしか溶解できないことが分かった。そこで、グリチルリチン酸を緩衝水溶液に溶解させると、pH4.5以上で急激に溶解し始めることが分かった(図2)。

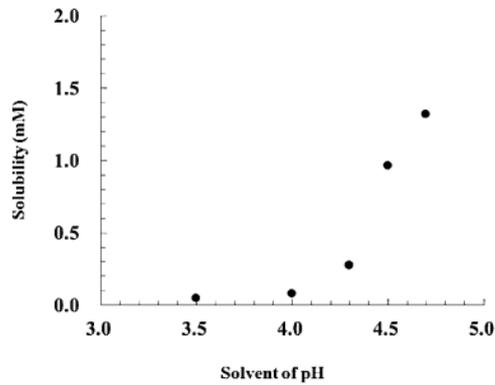


図 2. グリチルリチン酸の緩衝水溶液への溶解度

このため、強酸水溶液中では実験できず、pH5以上の緩衝水溶液を研究に用いた。また、水に溶解したグリチルリチン酸を水酸化ナトリウムで中和していくと、図3のように変化する。

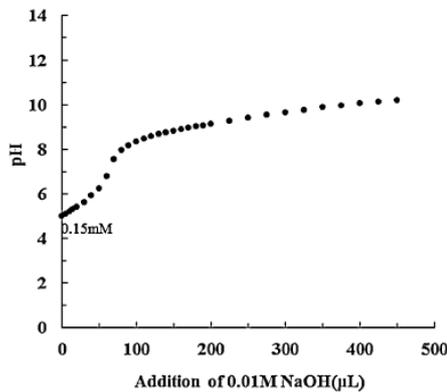


図 3. グリチルリチン酸水溶液の中和曲線

図3に示すように、そのpHは5-8の間で変化する。通常の強酸-強塩基の滴定曲線とは異なることから、その領域の間は3つのカルボン酸の解離が段階的に進むことを示している。つまり、この領域で分子の親水性と疎水性のバランスが変化し、塩基性方向に進むとH⁺が完全解離していることが読み取れる。故に、この領域を中心に緩衝水溶液のpHを変化させて研究を行った。

グリチルリチン酸水溶液の表面張力

両親媒性物質の表面張力低下能はその気泡性や液/液界面張力と密接な関係があり、界面活性作用を知る上で重要なパラメーターである。

そこで、緩衝溶液をpH5, 6, 7に調整して、pH変化に伴う表面張力測定の実験を行った。その結果を図4に示す。図4に示すように、cmc値はpH5で2.9 mM ($\gamma_{cmc} = 55.2 \text{ mN m}^{-1}$)、pH6で5.3 mM ($\gamma_{cmc} = 56.8 \text{ mN m}^{-1}$)であることが分かった。pH7では表面張力は低下したが、臨界ミセル濃度に対応する領域を決定することができなかった。

その結果をGibbsの吸着等温式(1)、(2)を用いて、その吸着量(Γ)と分子占有面積(A_{cmc})を見積もった。

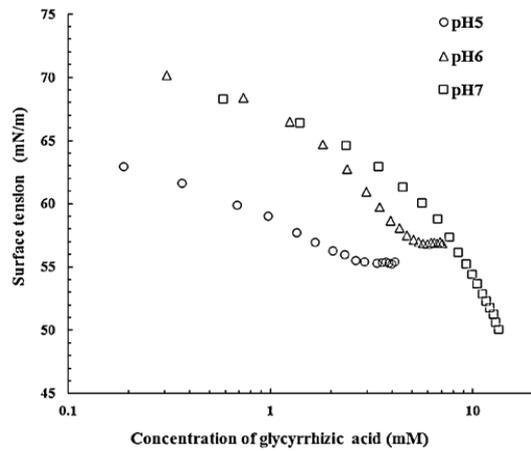


図 4. グリチルリチン酸水溶液の表面張力変化

$$\gamma = -\frac{1}{RT} \left[\frac{d\gamma}{d(\ln C)} \right] \quad \text{eq. (1)}$$

$$A_{cmc} = \frac{1}{N_{cmc}} \quad \text{eq. (2)}$$

R は気体定数、 T は絶対温度、 γ は表面張力値、 C は濃度である。解析結果を他の代表的な界面活性剤の値と共に表1に示した。

表 1. 表面特性のまとめ

surfactant	γ_{cmc} (mN m^{-1})	Γ_{cmc} ($10^{-6} \text{ mol m}^{-2}$)	A_{cmc} ($\text{nm}^2 \text{ molecule}^{-1}$)
Glycyrrhizic acid (pH5)	55.2	1.3	1.3
Glycyrrhizic acid (pH6)	56.8	2.9	0.57
Sodium cholate	50	1.17	1.41
Sodium dodecylsulfate	39.5	3.19	0.52

表1に示すように、弱酸領域での γ_{cmc} は約55mN/mであり、一般的な界面活性剤の表面張力値よりはやや高い。しかし、乳化剤として機能を果たせる十分な数値である。一方、表面への吸着量である Γ_{cmc} はpHの上昇とともに増加している。これは、バルク中のミセル形成と関連している。pH7ではグリチルリチン酸はミセルを形成していない。これは、分子内のカルボン酸の解離で親水性が増し、分子の疎水性が減少していくことに起因している。つまり、中性条件に近づくに従い、分子が親水性になり、ミセルを形成しなくても、モノマーとして存在することができるようになるためである。故に、バルク中のモノマー分子が増加し、気-液界面に吸着したと考えられる。グリチルリチン酸を乳化剤として機能させるには水溶液のpHを考慮する必要があることが分かった。

グリチルリチン酸の臨界ミセル濃度(cmc)

グリチルリチン酸が水溶液中で単独で会合体を形成できるならば、可溶化剤として適用できる可能性がある。表面張力測定法から、グリチルリチン酸は分子量が大きいにも関わらず、比較的そのcmc値が高いことが分かった。これはpH5以上では糖親水基中のカルボン酸が解離し、多価の親水基として機能していることに由来していると述べた。表面物性以外のアプローチから会合体を形成しているかどうか、ピレン蛍光プローブ法と光散乱測定法から決定した。ピレン蛍光プローブ法はプローブであるピレンの可溶化に基づ

く方法であるため、有機物が溶解できるかどうかの目安にもなる。図5にその結果を示す。

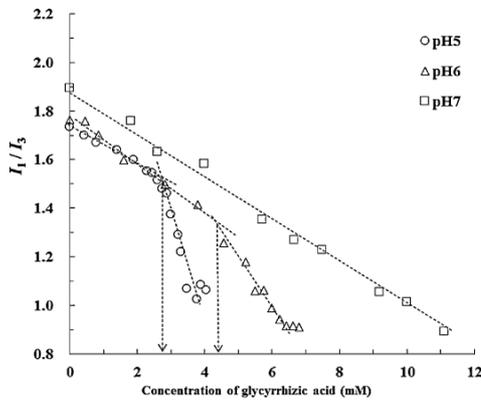


図5. ピレン蛍光プローブ法からのグリチルリチン酸水溶液の cmc の決定

図5に示すように、溶媒の pH に依存して、ある濃度から急激にピレンの蛍光強度比が減少する。これは、ピレンの I_3 ピークが増加したことに起因しており、ピレンが水から非極性の環境、つまり、グリチルリチン酸の疎水部と相互作用していることを意味している。pH7 の中性条件下では明確な I_1/I_3 比が変化するポイントは見つけれなかった。この現象は会合体形成に基づく、レーザー散乱強度の変化にも表れている。その結果を図6に示す。

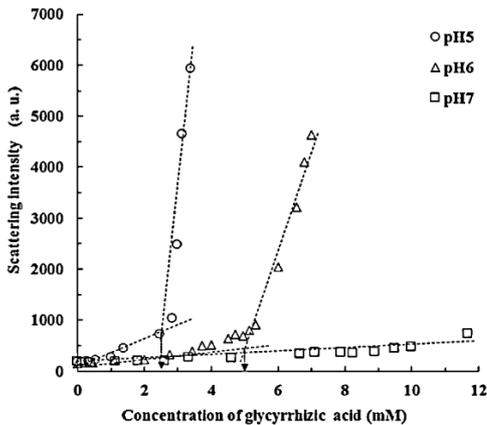


図6. グリチルリチン酸水溶液の光散乱強度変化

図6に示すように、弱酸性領域において、これまでの表面張力法とピレン蛍光プローブ法と同様な濃度 (cmc) で会合体を形成していることが分かる。pH7 の光散乱強度を見て分かるように、中性条件下では会合体を形成していない。これらの結果を表2にまとめた。若干の cmc 値のばらつきはあるが、これは測定法に起因するものである。ほぼ、同一の結果を得られおり、研究結果は確証を得られている。これまで、幾つか報告例ではグリチルリチン酸は水溶液中で会合体を形成しない例や、この報告値より1桁以上も低い値が記載されていたが、実験方法的にも矛盾のない結果が得られた。

表2. グリチルリチン酸水溶液の cmc

pH	cmc		
	surface tension (mmol dm ⁻³)	fluorescence probe (mmol dm ⁻³)	light scattering (mmol dm ⁻³)
pH5	2.9	2.7	2.5
pH6	5.3	4.4	5.0
pH7	monomer solution		

グリチルリチン酸が形成する会合体

前述したように、弱酸性水溶液中ではグリチルリチン酸は会合体を形成できる。この会合体がどのような構造をもつ会合体であるか、小角 X 線散乱 (SAXS) と透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて構造決定を行った。

図7に Spring-8 の BL402B ラインに設置されている SAXS 測定機で測定された散乱プロファイルを示す。

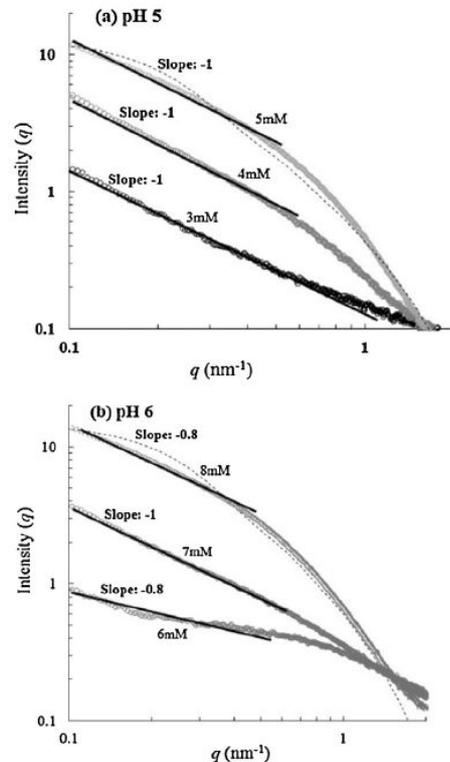


図7. グリチルリチン酸水溶液の SAXS プロファイル (a) pH5, (b) pH6 条件

最初のアプローチとして、その散乱曲線はギニエの近似式を用いて解析した。

$$\ln I(q) = \ln I(0) - R_g^2/3 \cdot q^2 \quad \text{eq. (3)}$$

式3のギニエの近似式の直線の傾きは、会合体の幾何学的形状と関係している。例えば、球状の会合体ではその傾きは-4であり、円盤状では-2、棒状では-1である。解析の結果、pH5 と pH6 の両条件下でも、直線の傾きは-1であることが分かった。故に、グリチルリチン酸は水溶液中で棒状ミセルを形成していることが分かった。

その会合体構造の詳細は棒状モデルの形状因子 ($P(q)$) の式を用いると、更に会合体サ

$$P(q) = \int_0^\pi \frac{\sin^2(qH\cos\alpha)}{q^2 H^2 \cos\alpha} \frac{4J^2(qR\sin\alpha)}{q^2 R^2 \sin\alpha} \sin\alpha d\alpha$$

イズの情報を得ることができる (eq. 4)。その結果、pH5 の条件下で円柱の半径 1.5nm、長さが 21nm であることが分かった。また、pH6 の条件では円柱の半径 1.5nm、長さが 18nm と決定した。

TEM を用いてこの棒状会合体を観察した。pH5 で 3mM の濃度のイメージを図 8 に示す。

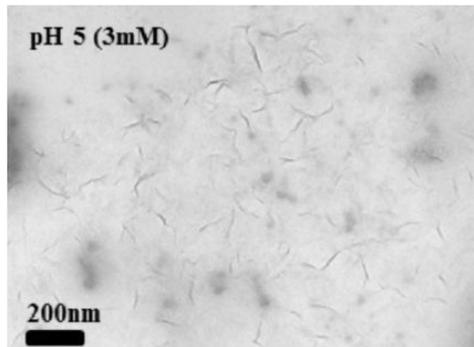


図 8. グリチルリチン酸水溶液 TEM イメージ (pH5, 3mM)

図 8 に示すように、グリチルリチン酸は棒状ミセルを形成していることが分かる。そのサイズは様々であるが、SAXS で解析した値よりやや大きく見える。しかし、Negative 染色法では水分子が蒸発する過程で会合体の凝集もあるため、おおよそ一致しているように思われる。形状に関しては予測どおりであった。

グリチルリチン酸は親水基の位置が頭部とグルクロン酸部分の二つに分離しているため、両親媒性分子としてはバランスが悪い。一般的には疎水部と親水部が分離し、その親水部が小さいほうが大きな会合体を形成しやすいと言われている。今回、pH に依存して、会合体が形成できることを示した。また、その会合体が棒状ミセルであることは分子の幾何学的な考察の観点から見ても、興味深い結果となった。

(2) グリチルレチン酸 3-O-グルクロニドの会合体形成

グリチルレチン酸 3-O-グルクロニドは図 9 に示すようにグリチルリチン酸からグルクロン酸が 1 つ少ない分子構造をもつ。両親媒性物質の会合体形成は分子中の疎水基と親水基のバランスが影響を及ぼす。糖親水基が 1 つ減少したグリチルレチン酸 3-O-グルクロニドの会合体形成に関する研究を行った。グリチルレチン酸 3-O-グルクロニドは二つの弱酸基のカルボン酸をもつので、水に溶かしても、殆ど溶解しない。そこで、中性条件の pH7 の緩衝水溶液に固定して実験を行った。

グリチルレチン酸 3-O-グルクロニドの pH7.0 における cmc は図 10 の表面張力測定の結果に基づくように、約 1mM であることが分

かった。グリチルリチン酸の cmc 値の約 3-5mM と比較すると、糖親水基の減少により低濃度で会合することが分かった。

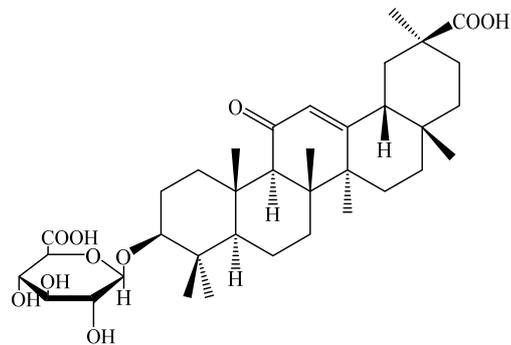


図 9. グリチルレチン酸 3-O-グルクロニド

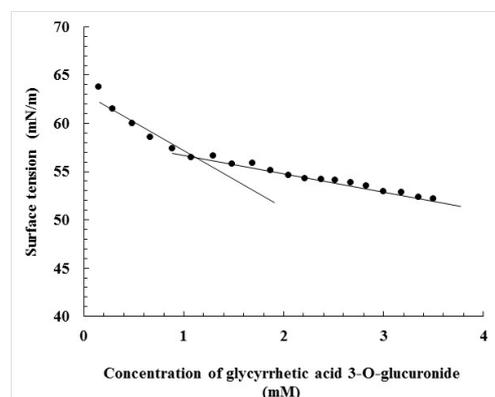


図 10. グリチルレチン酸 3-O-グルクロニド水溶液の表面張力変化

グリチルレチン酸 3-O-グルクロニドの結晶を pH7 の緩衝溶液に溶解し、光散乱装置による観測およびキュムラント法解析から平均流体力学半径を求めた。会合体サイズは、cmc 近傍で流体力学半径が約 100nm の会合体を形成し、そのサイズは濃度と共に増加し、約 200nm まで成長した (図 11)。

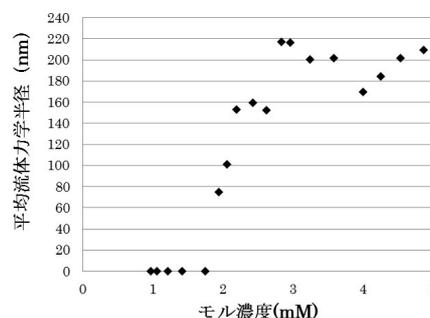


図 11. グリチルレチン酸 3-O-グルクロニド会合体サイズの流体力学半径

図 11 よりグリチルレチン酸 3-O-グルクロニドは、通常ミセルとは異なり、比較的大きな会合体を形成している。この会合体構造を、SAXS と電子顕微鏡を用いて解析した。

SAXS 測定の結果を図 12 に示す。その散乱曲線はギニエの近似式を用いて解析した。ギニエの近似式の直線の傾きは、会合体の幾何学的形状と関係していることは先に述べた。図 12 中に直接示すように、その直線の傾きは-2であり、円盤状の会合体を形成していることを意味している。

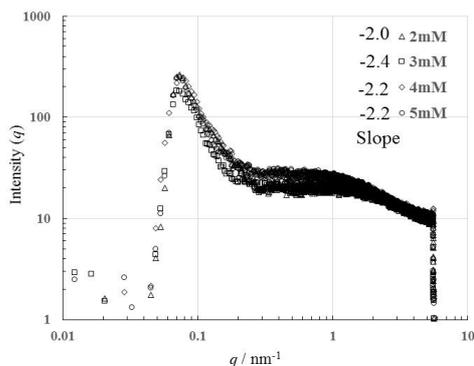


図 12. グリチルレチン酸 30 グルクロニド水溶液の SAXS プロファイル (pH7)

Cryo-走査型電子顕微鏡によるマイクログラフを図 13 に示す。その会合体は球形から円盤状の会合体であり、濃度増加とともに会合体同士が合一しているように見えた。ひも状ミセルを形成するグリチルリチン酸とは会合体構造が大きく異なることが分かった。また、2次元 NMR 測定の結果から、この会合体は疎水基のアグリコン同士の強い疎水性相互作用があることが判明した。以上より、親水基と疎水基のバランスは会合体形成に大きな影響を及ぼすことが示された。その分子構造のわずかな違いにより形状の異なる会合体を形成することがわかった。

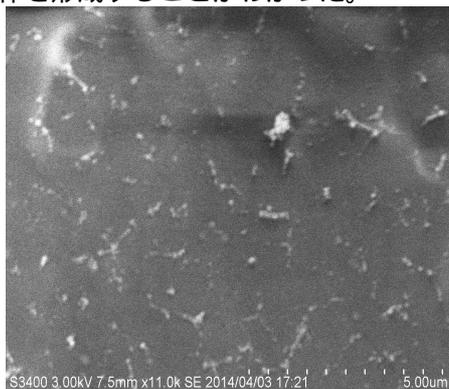


図 13. Cryo-SEM 撮影によるグリチルレチン酸 30 グルクロニド会合体

(3) 結論

研究を開始して、最初に直面した問題がグリチルリチン酸類の結晶の溶解性と測定の再現性の問題であった。一般的にグリチルリチン酸は添加物として用いられ、単独ではなく他の成分と混合して溶解させる。純水での研究報告が少なかったことが、実験条件を決める上で時間を要した一因でもある。そのため、まず水溶媒に溶かすこと、次に安定した溶液物性を再現することに多くの時間を

要してしまった。学会発表時に、化粧品関係の複数の研究者から溶解性に関してのアドバイスを求められた。これは、グリチルリチン酸類の溶液物性を決定するのは3個のカルボン酸基であり、溶媒の水素イオン濃度が溶液物性に大きく依存する事と関連している。今回、当初の計画に対して、全てを行うことができず、また報告も済んでいない部分もある。残りの研究に関しては、これから1-2年かけて論文発表を行い、この研究を終了させたい。グリチルリチン酸類は、化粧品と医薬品の分野で現在も多く使用されており、この物質の溶液中での基本物性を明らかにできたことは大きな成果だと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Keisuke Matsuoka, Ryusuke Miyajima, Yudai Ishida, Seigo Karasawa, and Tomokazu Yoshimura, Aggregate formation of glycyrrhizic acid. 査読有 Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 500, 112-117, 2016.
DOI: 10.1016/j.colsurfa.2016.04.032

〔学会発表〕(計4件)

Keisuke Matsuoka, Aggregation formation of Glycyrrhizic acids, 6th Asian Conference on Colloid and Interface Science, 2015年11月24日、Arkas Sasebo (佐世保)。

松岡圭介、グリチルリチン酸類水溶液の表面物性と会合体形成、第54回日本油化学会年会、2014年9月8日、名城大学(名古屋)。

松岡圭介、グリチルリチン酸の会合体形成、第64回コロイドおよび界面化学討論会、2013年9月18日、名古屋工業大学(名古屋)。

松岡圭介、グリチルレチン酸30 グルクロニドの会合体形成、第53回日本油化学会年会、2013年9月10日、ホテルロイトン札幌(札幌)。

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.saitama-u.ac.jp/~matsuokake/m/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 圭介 (MATSUOKA, Keisuke)

埼玉大学・教育学部・准教授

研究者番号：90384635