

令和 2 年 8 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14281

研究課題名（和文）低毒性セルロース溶媒「双性イオン液体」による漢方ゲルの直接作製

研究課題名（英文）Direct preparation of gels from herbal medicinal plants by using a low toxicity liquid zwitterion

研究代表者

黒田 浩介（Kosuke, Kuroda）

金沢大学・生命理工学系・准教授

研究者番号：10748891

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：低毒性なセルロース溶媒であるliquid zwitterionを用いて、薬用植物である甘草を溶解・析出させるのみで、薬効成分を含む甘草ゲルを作製した。その甘草ゲルは3時間で甘草の主成分であるグリチルリチン酸を徐々に放出した。また、ゲル作製時にセルロースを添加するだけで、グリチルリチン酸の放出挙動を変化させることなくゲルの強度を向上させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低毒性なセルロース溶媒であるliquid zwitterionを用いて、薬用植物である甘草を溶解・析出させるのみで、薬効成分を含む甘草ゲルを作製した。これまでに薬用植物から、その成分を含むゲルを直接的に作ることはできなかった。ゲルを直接作製できることで有効成分を失わずに成形できること、その成分の徐放をおこなうこと、塗布薬にすることなどが可能となった。

研究成果の概要（英文）：Gels containing medicinal ingredients of licorice were formed by dissolving into a biocompatible zwitterionic cellulose solvent and successive precipitation. The licorice gels gradually released glycyrrhizic acid, the main medicinal ingredient of licorice, within 3 h. Although the licorice gels were mechanically weak, gel strength was improved just by adding cellulose during the preparation of the gels.

研究分野：グリーンケミストリー

キーワード：イオン液体 甘草 漢方 ゲル 双性イオン液体 グリチルリチン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、薬用植物からの生理活性物質を高効率で抽出する方法が幅広く検討されている。従来の抽出技術には、水や有機溶媒を用いた通常の抽出に加えソックスレー抽出などがあるが抽出効率が悪いという問題がある。そこで近年、抽出における技術開発と応用が注目されており、その中の一つとして、セルロース溶解能をもつイオン液体を用いた手法がある。そのようなイオン液体は植物細胞壁を破壊できるため、内部の生理活性物質を効率よく抽出できることが報告されている。しかしながら、イオン液体は毒性が高いとされている。そのため、現時点では未分類であるが医薬品処理に利用可能な溶媒リスト (Impurities: Guideline for residual solvents; The International council fir Harmonisation of Technical Rewuirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2011.) に含まれない可能性が高い。

2. 研究の目的

我々は本研究室で開発した liquid zwitterion である OE₂imC₃C (Figure 1) に着目した。OE₂imC₃Cはセルロース溶解能を持ち、また微生物に対して低毒性であることが分かっている。例えば、典型的なセルロース溶解能を持つイオン液体である 1-ethyl-3-methylimidazoliumacetate と比べて 60 分の 1 程度である。また薬品処理に使用可能な溶媒リストに含まれるジメチルスルホキシドと比べてもその毒性は 2 分の 1 程度の毒性であることが分かっている。そのため、我々はイオン液体が抱える毒性の問題を解決しつつ、生理活性物質を薬用植物から効率よく抽出する溶媒として使用できると考えた。

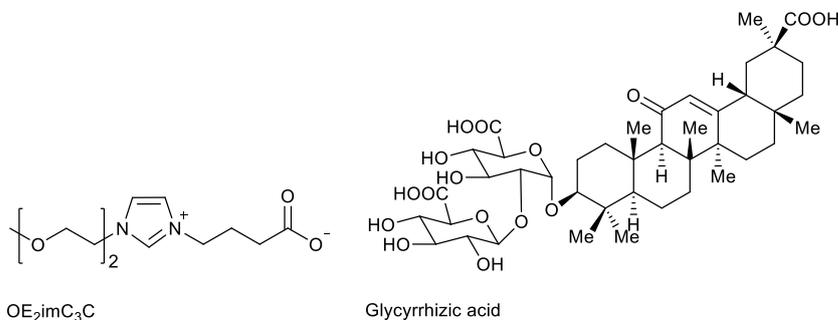


Figure 1. Structures of OE₂imC₃C and glycyrrhizic acid.

さらにここで我々は、セルロース溶液を貧溶媒に滴下すると、セルロースが析出してゲルになるという特徴にも注目した。この特徴を活かすことで、薬用植物を OE₂imC₃C に溶解した後、貧溶媒に滴下するのみで薬効成分を包括したセルロースゲルを作製できるのではないかと考えた。薬用植物から直接ゲルを作製することで、薬効成分のロスを防ぐだけでなく、薬効成分を放出するソフトマテリアルとして利用できるようになる。本研究では、OE₂imC₃C を使用して生薬である甘草から効率的に薬効成分を抽出した後、その薬効成分を包括したセルロースゲルを作製した。さらにゲルからの薬効成分の放出挙動を観測した。

3. 研究の方法 (甘草ゲルの作製と放出されたグリチルリチン酸 (構造は Figure 1 参照) の量の測定)

150mM のリン酸バッファー (pH 5.0, 7.4)、もしくは、トリス塩酸バッファー (pH 9.0) を作製し使用した。OE_{2imC₃C} 0.48 g に甘草を 0.02 g となるように加え 120 °C で 2h 攪拌した。それぞれの緩衝液 15 mL に対して OE_{2imC₃C}/甘草溶液を 0.3 g となるよう滴下しゲルを作製した後、振とう機で常温にて振とうした。振とう中は 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.7, 1, 2, 3, 6, 24 h ごとに 400 μl ずつ溶媒を採集し、上記同様にグリチルリチン酸濃度を測定し、放出率を計算した。

Release ratio of glycyrrhizic acid (%)

$$= \frac{\text{The amount of glycyrrhizic acid } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \times 15(\text{mL})}{\text{The amount of licorice } (\mu\text{g})} \times 100$$

4. 研究成果

(1) 抽出率

我々は薬用植物として、漢方薬の 7 割に含まれる生薬の甘草を使用した。はじめに、OE_{2imC₃C} を利用して甘草からその主成分であるグリチルリチン酸を高効率に抽出できることを確認した。そのために OE_{2imC₃C}、水を用いて甘草 (4 wt%) から薬効成分を 95 °C で抽出しその効率について比較した (Figure 2)。その結果、水を用いた場合の抽出率は 2.4 % だった (甘草の添加量を 100 % として計算)。グリチルリチン酸は一般的に甘草中に 2 % 以上含まれるためこの数値は妥当である。対して OE_{2imC₃C} を用いた場合の抽出率は 4.1 % であり、OE_{2imC₃C} を使用したほうが高効率でグリチルリチン酸を抽出できることが分かった。このことから、セルロース溶解能を持つ通常のイオン液体だけでなく低毒性な OE_{2imC₃C} を用いた場合でも薬効成分を高効率で抽出できることが確認された。

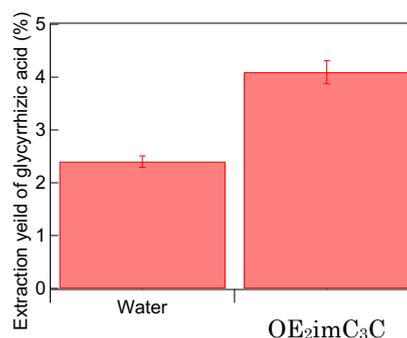


Figure 2. Extraction yield of glycyrrhizic acid from licorice by using water or OE_{2imC₃C} at 95 °C.



Figure 3. A picture of licorice gels prepared by using OE_{2imC₃C}.

(2) 漢方薬ゲルの作製

OE_{2imC₃C}/甘草溶液からセルロースゲルを作製できるのか確かめた。OE_{2imC₃C} に 4 wt% の甘草 (OE_{2imC₃C}:甘草=96:4) を溶解し、マイクロピペットを用いてその溶液を pH 7.4 (生理条件) の緩衝液に滴下した。この時、溶液の粘性が高かったため高粘性溶液用マイクロピペットを用いた。その結果、buffer に滴下することで植物中に含まれる高分子が析出しゲルを作製することができた (Figure 3)。また、pH 5.0, 9.0 の緩衝液、超純水、メタノールを用いても同様にゲルを作製することができた。

(3) 甘草ゲルからのグリチルリチン酸の放出

作製したゲルから薬効成分を放出できるのか確認した。その際貧溶媒として、pH 5.0, 7.4, 9.0 の緩衝液を用い、その溶媒を時間ごとに採取することにより、ゲルからのグリチルリチン酸放出挙動を観察した (Figure 4)。pH 7.4 の場合では、0.2, 0.4, 1, 3 h でのグリチルリチン酸濃度は

それぞれ 1.5, 2.4, 3.4, 4.2 %であった。このことから、徐々にゲルからグリチルリチン酸が放出されたことが分かった。また、6, 24h 後のグリチルリチン酸濃度は 4.2, 4.0 %となっており、3h における濃度と変わらなかったことから約 3h で放出が終了したと考えられる。

また 24h においてわずかに放出率が下がっており、グリチルリチン酸が糖とグリチルレチン酸に加水分解された可能性がある。そこで液体クロマトグラフィー/質量分析によってグリチルレチン酸を測定したが検出されなかった。そのため、他の化合物に分解された、もしくは値の低下そのものが誤差であると思われる。

pH 9.0 の場合では、0.2, 0.4, 1, 3, 6, 24h におけるグリチルリチン酸濃度は 0.8, 1.9, 2.9, 3.9, 4.0, 4.1%となっており、pH 9.0 と同様グリチルリチン酸が徐々に放出され、3h で放出が終了した。pH 5.0 の場合、0.2, 0.4, 1, 3h におけるグリチルリチン酸濃度は 0.5, 1.2, 2.1, 3.4 %となり徐々にグリチルリチン酸が放出され、pH 7.4, 9.0 の緩衝液の時と比べて放出率が低いことがわかった。6, 24h においても、3.5, 3.4 %であり 3h のときの放出率と同じであり放出が遅いのではなく、放出の上限が低いことが示された。

この原因は、各 pH におけるグリチルリチン酸の飽和溶解度の違いであると考えた。そこで、それぞれの緩衝液におけるグリチルリチン酸の飽和溶解度について検討した。それぞれの緩衝液に対して 40, 30, 27, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにグリチルリチン酸を添加し、顕微鏡で結晶の有無を観察することで飽和溶解度について検討した。pH 7.4, 9.0 の緩衝液においては、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でグリチルリチン酸が溶解していたのに対し、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では結晶が多数観察された。このことから、pH 7.4 および 9.0 の緩衝液のグリチルリチン酸の飽和溶解度は 30~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の間であった。Figure 4 において pH7.0 及び 9.0 の緩衝液を用いた時のグリチルリチン酸の終濃度はそれぞれ、34, 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり飽和溶解度と同等であった。対して pH 5.0 の緩衝液では 30~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においては多数の結晶が観察された。27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ではグリチルリチン酸が溶解していた。そのため、pH 5.0 におけるグリチルリチン酸飽和溶解度は約 27~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の間であった。Figure 4 において、pH 5.0 の緩衝液を用いた時のグリチルリチン酸の終濃度は、26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり飽和溶解度とおよそ一致した。このことから、放出率が pH 7.4 および 9.0 の緩衝液と比べて pH 5.0 の緩衝液を使用したときの方が低くなった原因は、ゲル構造ではなくグリチルリチン酸の飽和溶解度であることが示された。また、グリチルリチン酸はカルボキシル基を有し、pH 5.0 ではプロトンの解離度が低い (e.g. 酢酸の解離定数 : 4.76)。そのため、数十%のカルボン酸が電荷的に中性な状態であり、水との相互作用が弱く溶解度が低かったと考えられる。

これらのことから、甘草から直接的に作製したゲルからグリチルリチン酸を放出できることが確認され、さらに使用する貧溶媒の pH によってグリチルリチン酸の放出量に変化することが分かった。このことから胃などの低 pH 環境下ではグリチルリチン酸が放出されづらく、他の中性以上の pH 環境下では放出されやすい甘草ゲルを作製することができた。

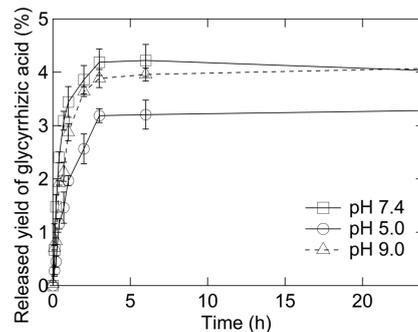


Figure 4. Relationship between the extraction yield of glycyrrhizic acid and the time that the gels are immersed in pH 5.0, 7.4, and 9.0 buffer solutions. *Calculated using the amount of licorice loaded as 100%.

参考文献

C. Kodo, K. Kuroda*, K. Miyazaki, H. Ueda, K. Ninomiya, K. Takahashi, *Polym. J.*, 52, 467-472 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 C. Kodo, K. Kuroda, K. Miyazaki, H. Ueda, K. Ninomiya, K. Takahashi	4. 巻 52
2. 論文標題 Direct preparation of gels from herbal medicinal plants by using a low toxicity liquid zwitterion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 467-472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41428-019-0289-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 H. Nan, K. Kuroda, K. Takahashi, J. L. Anderson	4. 巻 1603
2. 論文標題 Examining the unique retention behavior of volatile carboxylic acids in gas chromatography using zwitterionic liquid stationary phases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 288-296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2019.06.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 I. Pacheco-Fernandez, M.J. Trujillo-Rodriguez, K. Kuroda, A.L. Holen, M.B. Jensen, J.L. Anderson	4. 巻 200
2. 論文標題 Zwitterionic polymeric ionic liquid-based sorbent coatings in solid phase microextraction for the determination of short chain free fatty acids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Talanta	6. 最初と最後の頁 415-423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.talanta.2019.03.073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ryunosuke Nishita, Kosuke Kuroda, Shiori Suzuki, Kazuaki Ninomiya, Kenji Takahashi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Flame-retardant plant thermoplastics directly prepared by single ionic liquid substitution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polymer J.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8NJ04797A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Idaira Pacheco-Fernandez, Maria J. Trujillo-Rodriguez, Kosuke Kuroda, Andrew L. Holen, Mark B. Jensen, Jared L. Anderson	4. 巻 200
2. 論文標題 Zwitterionic polymeric ionic liquid-based sorbent coatings in solid phase microextraction for the determination of short chain free fatty acids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Talanta	6. 最初と最後の頁 415-423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.talanta.2019.03.073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kosuke Kuroda, Yumiko Shimada, Kenji Takahashi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Hand-holding and releasing between the anion and cation to change their macroscopic behavior in water	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Green Energy Environ.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gee.2018.12.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kosuke Kuroda, Chiaki Kodo, Kazuaki Ninomiya, Kenji Takahashi	4. 巻 72
2. 論文標題 A polar liquid zwitterion does not critically destruct cytochrome c at high concentration: an initial comparative study with a polar ionic liquid	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Aust. J. Chem.	6. 最初と最後の頁 139-143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1071/CH18533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kosuke Kuroda, Yumiko Shimada, Kenji Takahashi	4. 巻 42
2. 論文標題 CO2-triggered fine tune of electrical conductivity via tug-of-war between ions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 New J. Chem.	6. 最初と最後の頁 15528-15532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8NJ02642D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takatsugu Endo, Shunsuke Fujii, Ei Mon Aung, Kosuke Kuroda, Takayuki Tsukegi, Kazuaki Ninomiya, Kenji Takahashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Cellulose Structural Change in Various Biomass Species Pretreated by Ionic Liquid at Different Biomass Loadings	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioResources	6. 最初と最後の頁 6663-6677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Heri Satria, Kosuke Kuroda, Yota Tsuge, Kazuaki Ninomiya, Kenji Takahashi	4. 巻 42
2. 論文標題 Dimethyl sulfoxide enhances both cellulose dissolution ability and biocompatibility of a carboxylate-type liquid zwitterion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 New. J. Chem.	6. 最初と最後の頁 13225-13228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8NJ01912FK. Kuroda	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 K. Kuroda
2. 発表標題 Development of low-toxic cellulose solvents and their medical application as an Asian researcher
3. 学会等名 The 99th Annual Meeting of The Chemical Society of Japan-Asian International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Kuroda, H. Satria, K. Ninomiya, K. Takahashi
2. 発表標題 One-pot biomass conversion to ethanol in biocompatible liquid zwitterions
3. 学会等名 the 6th Asian-Pacific Congress on Ionic Liquid & Green Processes (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Kuroda
2. 発表標題 Biorefinery with Biocompatible Liquid Zwitterions
3. 学会等名 Annual symposium of ionic liquid research association Japan and Sophia Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Kuroda, H. Satria, K. Ninomiya
2. 発表標題 One-pot biomass conversion to ethanol in biocompatible liquid zwitterions
3. 学会等名 the 6th Asian-Pacific Congress on Ionic Liquid & Green Processes (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Kuroda, C. Kodo, K. Ninomiya, K. Takahashi
2. 発表標題 Herbal medicinal gels prepared by using a low-toxic liquid zwitterion
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田浩介、高橋憲司
2. 発表標題 Zwitterionへ可逆的に変換可能なイオン液体
3. 学会等名 第9回イオン液体討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田浩介、附木貴行、仁宮一章、高橋恵司
2. 発表標題 炭素繊維強化プラスチックへ向けたリグニン由来の相溶化剤の開発
3. 学会等名 第67回高分子討論会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田浩介
2. 発表標題 炭素繊維強化プラスチックへ向けたリグニン由来の相溶化剤の開発
3. 学会等名 産総研コンソーシアム持続性木質資源工業技術研究会 第40回研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田浩介・鴻渡千亜季・仁宮一章・高橋恵司
2. 発表標題 細胞壁を利用した漢方ゲルの直接作製
3. 学会等名 セルロース学会第25回年次大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shiori Suzuki, Kosuke Kuroda, Kenji Takahashi	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 in press
3. 書名 Encyclopedia of ionic liquids	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ページ

<http://ionicliquid.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----